



**Ana Mafalda Vidal
Tavares da Silva**

N.º Mec.:27206

**Armazenamento Hiperbárico à Temperatura
Ambiente de Sumo de Melancia como Alternativa
à Refrigeração**

**Hyperbaric Storage at Room Temperature of
Watermelon Juice as an Alternative to
Refrigeration**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2016

**Ana Mafalda
Vidal Tavares da Silva**

N.º Mec.:27206

**Armazenamento Hiperbárico à Temperatura
Ambiente de Sumo de Melancia como Alternativa
à Refrigeração**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Júri

Presidente Doutor Pedro Miguel Neves Domingues
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Vogais Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva (orientador)
Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Elisabete Maria da Cruz Alexandre
Bolsista Pós-Doutoramento da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Agradecimentos

Agradeço em geral a todos que direta ou indiretamente estiveram a meu lado e que contribuíram para o sucesso na realização desta tese.

Ao professor Jorge Saraiva, pelo desafio colocado para a realização deste trabalho, por ter acreditado em mim, pela disponibilidade, pela atenção e por todo o apoio demonstrado ao longo do tempo.

Aos membros do grupo INNOVATE, Liliana, Mauro, Rui, Maria João, Rita, Sílvia, Ricardo pelo apoio, disponibilidade, amizade, convívio, risadas e partilha de conhecimentos.

Agradeço aos meus colegas Carlos, Catarina, Álvaro Patrícia e Luís pela interajuda ao longo destes dias nesta caminhada de aprendizagem.

Aos meus amigos que estiveram presentes nos momentos mais desafiantes.

E por fim, à minha família. Obrigado por acreditarem que eu era capaz de ir mais além.

Palavras-chave

Armazenamento hiperbárico, sumo de melancia, conservação alimentar, refrigeração, carga microbiana, parâmetros físico-químicos.

Resumo

O armazenamento hiperbárico (AH) é um método de conservação alimentar que se baseia no uso da pressão como principal fator para retardar a ação microbiana e de degradação de qualidade de forma a aumentar o tempo de vida útil dos alimentos.

O objetivo deste estudo centra-se na avaliação do AH à temperatura ambiente de sumo de melancia utilizando diferentes condições de pressão (0,1-100 MPa) a temperatura ambiente ($\approx 21^\circ\text{C}$) durante 10 dias de armazenamento. Esta avaliação foi realizada recorrendo a análises físico-químicas, microbiológicas e bioquímicas.

Tanto no sumo armazenado a 0,1 MPa e $\approx 21^\circ\text{C}$ como refrigerado a carga microbiológica aumentou para valores superiores a 6 Log UFC/mL para todos os microrganismos. Nas amostras a 50 MPa houve um aumento nos mesófilos aeróbios totais, *Enterobacteriaceae* e psicrófilos aeróbios totais, e uma diminuição nos bolores e leveduras em ≈ 2 log UFC/mL. O AH a pressões de 75 e 100 MPa reduziu a carga microbiológica para valores ≤ 1 Log UFC/mL após 10 dias. A maioria dos parâmetros físicos-químicos manteve-se constante no AH a 50 e 100 MPa.). A 100 MPa obteve-se a maior concentração de licopeno em comparação com as outras condições de armazenamento. A atividade enzimática da peroxidase (POD) ($40,63 \pm 1,98$) e da pectina metilesterase (PME) ($43,65 \pm 1,52$) foi inferior no AH a 50 e 100 MPa, enquanto a atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) foi superior nestas amostras ($49,15 \pm 6,32$ e $54,20 \pm 1,58$ respetivamente).

Foi realizado também um ensaio de AH utilizando sumo de melancia pasteurizado previamente por alta pressão a 600 MPa à $\approx 21^\circ\text{C}$ durante 6 minutos e armazenado a 50 MPa (à temperatura ambiente) durante 75 dias. Neste ensaio verificou-se que a carga microbiana manteve-se constante com valores ≤ 1 Log UFC/mL durante os 75 dias de armazenamento. Os parâmetros físico-químicos mantiveram-se constantes ao longo dos 75 dias de armazenamento em todas as condições de armazenamento. No caso da atividade enzimática, após 75 dias de armazenamento, a atividade da PPO, POD e PME nas amostras a 50 MPa foi reduzida em 26, 50 e 45%, respetivamente, verificando-se uma redução similar no caso das amostras refrigeradas (23, 45 e 40%, respetivamente). Por outro lado, nas amostras armazenadas a 0,1 MPa observou-se uma redução superior de 45, 66 e 58%, respetivamente, logo após 15 dias de armazenamento.

Com base nos resultados obtidos este método pode ser considerado como uma possível alternativa à refrigeração para a conservação de sumo de melancia.

Keywords

Hyperbaric storage, watermelon juice, food preservation, refrigeration, microbial load, physicochemical parameters

Abstract

Hyperbaric Storage (HS) is a method of food preservation that relies on the use of pressure as the main factor to retard microbial and quality degradation in order to increase the food shelf life.

The objective of this study is based on the HS at room temperature of watermelon juice using different pressure conditions (0.1-100 MPa) at room temperature ($\approx 21^{\circ}\text{C}$) for 10 days of storage. Microbiological, physicochemical and biochemical analyses were carried out.

In juice stored at 0.1 MPa and $\approx 21^{\circ}\text{C}$ and under refrigeration the microbiological load increased to values ≥ 6 Log CFU/mL for all microorganisms. In samples at 50 MPa there was an increase in total aerobic mesophiles, *Enterobacteriaceae* and total aerobic psychrophiles, and a decrease in yeasts and molds of about 2 log UFC. The HS at pressures of 75 and 100 MPa caused a reduction of the microbiological load to values ≤ 1 Log CFU/mL after 10 days. Most of the physicochemical parameters kept constant in the HS at 50 and 100 MPa. At 100 MPa higher lycopene concentration was obtained which increased compared to the other storage conditions. The activities of peroxidase (POD) and pectin methylesterase (PME) were lower in HS at 50 and 100 MPa. While the enzymatic activity of polyphenoloxidases (PPO) was higher in these samples.

A different HS assay was also performed using high pressure pasteurized watermelon juice at 600 MPa at $\approx 21^{\circ}\text{C}$ for 6 minutes and stored at 50 MPa (room temperature) for 75 days. In this assay it was verified that the microbial load remained constant with values ≤ 1 log CFU/mL during the 75 days of storage. The physicochemical parameters remained constant throughout the 75 days of storage in all storage. In the case of enzymatic activity, after 75 days of storage, the PPO, POD and PME activities were reduced in the 50 MPa samples by 26, 50 and 45%, respectively, being similar to refrigerated samples (23, 45 and 40%, respectively). On the other hand, samples stored at 0.1 MPa it was observed a higher reduction of about 45, 66 and 58% after 15 days.

Based on the obtained results this method can be considered as a possible alternative to refrigeration for the conservation of watermelon juice.

Conteúdos

Índice

Lista de Figuras-----	iii
Lista de Tabelas-----	vi
Lista de Abreviaturas-----	vi
1 Introdução-----	1
1.1. Processamento por Alta Pressão-----	2
1.1.1. Princípios operacionais da alta pressão-----	3
1.1.2. Descrição do processo-----	4
1.2.1 Efeito da alta pressão sobre nos microrganismos-----	4
1.2.2. Efeito da alta pressão nos constituintes dos produtos alimentares-----	6
1.3. Armazenamento Hiperbárico-----	7
1.3.1. Armazenamento hiperbárico à temperaturas de refrigeração-----	8
1.3.2. Armazenamento hiperbárico à temperatura ambiente-----	8
1.3.3. Efeito do armazenamento hiperbárico à temperatura ambiente nos parâmetros físicos-químicos-----	21
1.3. Armazenamento pós-hiperbárico-----	22
1.4. Caso de estudo – sumo de melancia-----	22
2. Objetivos-----	25
3. Materiais e Métodos-----	27
3.1. Preparação do sumo de melancia-----	28
3.2. Condições de armazenamento-----	28
3.3. Análises microbiológicas-----	29
3.4. Análises físico-químicas-----	30
3.5. Análises Bioquímicas-----	32
4. Resultados e Discussão-----	34
4.1. Armazenamento de sumo de melancia fresco-----	35
4.1.1. Análises microbiológicas-----	35
4.1.2. Análises Físico-químicas-----	40
4.1.3. Análises Bioquímicas-----	47

4.2. Armazenamento de sumo processado por alta pressão-----	49
4.2.1. Análises microbiológicas-----	49
4.2.2. Análises Físico-químicas-----	50
4.2.3. Análises Bioquímicas-----	56
5. Conclusão-----	61
6. Bibliografia-----	64
Anexo A-----	71

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema representativo do princípio isostático (Yordanov et al. 2010)---4

Figura 2. Avaliação microbiológica de mesofilos aeróbios totais, *Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras (expressos em Log UFC/mL) no sumo de melancia inicial e depois de 8 horas armazenados em diferentes condições de pressão (25, 50, 75, 100 e 150 MPa) e temperatura. Os valores acima de 6.00 e abaixo de 1.00 Log unidades respetivamente (-). As diferentes letras entre pressão/temperatura (a-h) indicam diferenças significativas ($p < 0.05$), * e # são indicativo de valores superiores de 6 e inferiores de 1 Log UFC/mL, respetivamente. Adaptado de Santos et al. (2014)---12

Figura 3. Avaliação microbiológica de mesofilos aeróbios totais, *Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras (expressos em \log_{10} UFC/mL) iniciais e depois do armazenamento hiperbárico da sopa de cenoura em diferentes condições de pressão (100 e 150 MPa) e temperatura (e 25 °C e 30°C) durante 4 e 8 horas. Condições do armazenamento do controlo (4°C, 0,1 MPa). Os valores 6 e 1 log unidades (barras a tracejado), correspondem a valores superiores a 6 unidades de log e inferiores a 1 unidade log respetivamente. Adaptado de Moreira et al. (2015)-----13

Figura 4. Avaliação microbiológica de mesofilos aeróbios totais (a), *Enterobacteriaceae* (b), bolores e leveduras (c) no sumo de melancia (expressos em \log_{10} UFC/mL) inicial e no armazenamento durante 8, 16, 24, 48 e 60 horas em diferentes condições de pressão (0,1 e 100 MPa) e temperatura Adaptado de Fidalgo et al. (2013)-----15

Figura 5. Composição volátil das amostras do sumo de morango armazenado em diferentes condições de pressão: a) Amostras a T_5°C a pressão atmosférica e b) Amostras a T_20°C a 50 MPa. MPa). Adaptado de Bremejo et al. (2014)-----20

Figura 6. Contagem de mesófilos aeróbicos totais (MAT) (Log UFC/mL) no sumo de melancia fresco, inicialmente e durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento-----35

Figura 7. Contagem dos psicrófilos aeróbios totais (PAT) (Log UFC/mL) no sumo de melancia fresco, inicialmente e durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento-----36

Figura 8. Contagem das *Enterobacteriaceae* (Log UFC/mL) no sumo de melancia fresco, inicialmente e durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento-----37

Figura 9. Contagem de bolores e leveduras (Log UFC/mL) no sumo de melancia fresco, inicialmente e durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento-38

Figura 10. Contagem de *Escherichia coli* (Log UFC/mL) no sumo de melancia fresco, inicialmente e durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento-----39

Figura 11. Contagem de <i>Listeria innocua</i> (Log UFC/mL) no sumo de melancia fresco, inicialmente e durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento-----	39
Figura 12. Valor do pH inicial de sumo de melancia fresco e ao longo de 4, 7 e 10 dias de armazenamento a diferentes condições de armazenamento-----	40
Figura 13. Valor da acidez titulável inicial de sumo de melancia fresco e ao longo de 4, 7 e 10 dias a diferentes condições de armazenamento-----	41
Figura 14. Grau de acastanhamento inicial de sumo de melancia fresco e após 4, 7 e 10 dias de armazenamento a diferentes condições de armazenamento-----	42
Figura 15. Variação de total de cor (ΔE^*) inicial e depois de 4, 7 e 10 dias de armazenamento em diferentes condições de armazenamento de sumo fresco-----	43
Figura 16. Valor inicial de licopeno em sumo de melancia fresco e após 4, 7 e 10 dias de armazenamento a diferentes condições-----	44
Figura 17. Valor inicial de compostos fenólicos no sumo de melancia fresco e após 4, 7 e 10 dias a diferentes condições de armazenamento-----	45
Figura 18. Valor dos compostos fenólicos inicial de sumo de melancia fresco e após 4, 7 e 10 dias de armazenamento a diferentes condições-----	46
Figura 19. Valor inicial de sólidos solúveis totais (SST) (°Brix) de sumo de melancia fresco e após 4, 7 e 10 dias de armazenamento-----	46
Figura 20. Atividade residual (AR) da PPO do sumo de melancia fresco, durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento de sumo fresco-----	47
Figura 21. Atividade residual (AR) da POD do sumo de melancia fresco, durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento de sumo fresco-----	48
Figura 22. Atividade residual (AR) da PME do sumo de melancia fresco, durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento de sumo fresco-----	49
Figura 23. Atividade residual (AR) da PPO do sumo de melancia pasteurizado com ar. durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento-----	57
Figura 24. Atividade residual (AR) da PPO do sumo de melancia pasteurizado sem ar. durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento-----	57
Figura 25. Atividade residual (AR) da POD do sumo de melancia pasteurizado com ar. durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento-----	58
Figura 26. Atividade residual (AR) da POD do sumo de melancia pasteurizado com ar. durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento-----	59

Figura 27. Atividade residual (AR) da PME o sumo de melancia pasteurizado com ar. durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento-----**60**

Figura 28. Atividade residual (AR) da PME o sumo de melancia pasteurizado sem ar. durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento-----**60**

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de estudos de armazenamentos hiperbáricos à temperatura ambiente-----**10**

Tabela 2. Composição nutricional por 100 g de melancia. Adaptado de Almeida (2003)-
-----**23**

Tabela 3. Valores dos parâmetros físicos-químicos do sumo pasteurizado a 600 MPa embalado com e sem ar, durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento-----**53**

Tabela 4. Valores da variação de cor ΔE^* do sumo pasteurizado embalado com e sem ar a 600 MPa, durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento-----**54**

Lista de Abreviaturas

AH - Armazenamento hiperbárico

AR - Atividade residual

AT - Acidez Titulável

ENT - *Enterobacteriaceae*

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

HPP – *Processamento por alta pressão*

MAT - Mesófilos aeróbicos totais

PPO - Polifenoloxidase

SST- Sólidos solúveis totais

UCF- Unidade formadora de colónias

PME - Pectina metilesterase

POD - Peroxidase

1- INTRODUÇÃO

1. Introdução

A conservação dos alimentos remonta aos princípios da humanidade, assistindo-se assim ao aparecimento de diversos métodos de conservação alimentar ao longo dos tempos, cujo objetivo é essencialmente a manutenção dos alimentos frescos por um longo período de tempo. Mais recentemente, o progressivo conhecimento dos efeitos negativos de alguns aditivos alimentares na saúde, impôs o desenvolvimento de pesquisas científicas visando o desenvolvimento de novos processos de conservação de alimentos **(Tewari et al. 2007)**. Atualmente a sociedade moderna regista uma crescente procura por produtos alimentares pouco processados, frescos, saudáveis mas simultaneamente seguros. Na tentativa de satisfazer esta exigência, surgiram novas tecnologias de conservação alimentar emergentes **(Knorr et al. 2011)**. As novas tecnologias não-térmicas tem vindo a ter maior procura porque ao mesmo tempo asseguram a segurança e a elevada qualidade nutricional mantendo as propriedades físico-químicas do alimento. O desenvolvimento científico progressivo permitiu o reconhecimento das características físico-químicas específicas bem como as oportunidades e potencialidades destas novas tecnologias, associadas ao conceito de alimentos funcionais e os seus benéficos à saúde **(Heinz et al. 2010)**. A preferência por estas novas tecnologias está relacionada com a capacidade de inativar os microrganismos e de conservar a qualidade nutricional e sensorial dos produtos alimentares. A nível industrial e comercial estas tecnologias apresentam potencial de aplicação no âmbito da redução do impacto ambiental através da redução dos custos energéticos associados ao processamento alimentar **(Toepfl et al. 2006)**. O processamento por alta pressão, a radiação ultravioleta, os campos elétricos pulsados são alguns exemplos de metodologias não-térmicas usadas na indústria alimentar **(Pereira et al. 2010)**.

Atualmente, a indústria alimentar regista uma utilização crescente destas tecnologias emergentes com a finalidade de conservar vários alimentos, como sumos de fruta e bebidas. Estas novas tecnologias estão a ser cada vez mais utilizadas na conservação alimentar em detrimento das tradicionais. A literatura refere que de todas as novas tecnologias, aquela que tem maior aplicação na indústria até ao momento é o processamento por alta pressão **(Rupasinghe et al, 2012)**. O processamento por alta pressão é já uma realidade habitual no processamento de vários produtos alimentares, tais como nos sumos de fruta, vegetais, ostras, compotas e em produtos de origem animal **(Rastogi et al. 2007)**.

As metodologias de conservação são necessárias para controlar as alterações microbiológicas de modo a assegurar a qualidade e segurança dos produtos alimentares. As metodologias convencionais utilizam em geral os sistemas de refrigeração, mas a sua consequente utilização causa alterações climáticas preocupantes bem como elevados custos na aquisição dos equipamentos de refrigeração. Tais razões impeliram a comunidade científica à substituição destes sistemas de refrigeração convencionais por tecnologias “amigas” do ambiente e com as quais é possível reduzir os custos energéticos associados à conservação alimentar (**James et al. 2010**). Recentemente, na tentativa de satisfazer estes requisitos, surgiu uma nova metodologia de conservação alimentar designada por armazenamento hiperbárico (AH) que quando realizada à temperatura ambiente torna-se numa alternativa amiga do ambiente uma vez que só necessita de energia na fase da compressão e descompressão do vaso de pressão (**Fernandes et al. 2014**).

1.1. Processamento por Alta Pressão

O processamento por alta pressão ou HPP (do inglês *High Pressure Processing*) é uma técnica inovadora não-térmica com crescente interesse nas últimas décadas na indústria alimentar. Um tratamento por HPP utiliza pressões entre 100 e 800 MPa combinado com temperaturas que variam entre 0 e 100 °C durante um determinado tempo de exposição, normalmente de alguns segundos a 20 minutos. O HPP é uma tecnologia de conservação alimentar promissora, com capacidade de inativar enzimas e microrganismos patogénicos ou deteriorativos responsáveis por intoxicações. Esta tecnologia inovadora surge como uma alternativa aos tratamentos térmicos, por utilizar a pressão como factor principal em detrimento da temperatura, podendo assim reduzir ou evitar alterações organológicas e nutricionais indesejáveis nos produtos alimentares ao nível do sabor e cor, durante o processamento (**Mújica et al. 2011**). As potencialidades desta tecnologia são reconhecidas na indústria alimentar em vários países devido ao aumento do número de pesquisas científicas realizadas e pelo crescente interesse na sua aplicabilidade a nível comercial (**Norton et al. 2008**). O sucesso desta tecnologia nos diversos países deve-se às suas inúmeras vantagens, nomeadamente pela redução do uso de agentes aditivos/conservantes (**Mújica et al. 2011**), permitindo a sua utilização em diferentes produtos alimentares, independentemente da sua forma, tipo e composição química, bem como à possibilidade de manter intactos os componentes relacionados com a cor e sabor. Esta tecnologia introduz um novo modo de processamento no

qual existe a possibilidade de reduzir os custos energéticos em comparação com os tratamentos térmicos convencionais (**Rastogi et al. 2007**).

O início da utilização desta tecnologia ocorreu em 1899 por Hite. Este autor referiu que a aplicação de pressões elevadas de cerca de 670 MPa durante 10 minutos poderia prolongar o tempo de vida útil de leite, devido à inativação dos microrganismos existentes (**Hite et al. 1899**). Esta tecnologia permaneceu pouco explorada até ao fim da década 80 do século XX, altura a partir da qual se registou o início da sua aplicação a nível industrial no Japão, em produtos processados, tais como geleias, compotas e molhos embalados (**Thakur et al 1998**). Apesar dos efeitos positivos evidenciados do uso desta tecnologia, os custos dos equipamentos reduziu a viabilidade comercial destes produtos (**Torres et al. 2005**). Atualmente, o desenvolvimento de novas pesquisas têm demonstrado que esta tecnologia apresenta efeitos benéficos, não só porque garante a segurança e a qualidade alimentar, mas também porque consegue manter as características nutricionais e sensoriais por um longo período de tempo (**Mújica et al. 2011**). Na Europa são várias as empresas a utilizarem o processamento por alta pressão numa grande variedade de produtos alimentares, tais como em sumos de frutas, vegetais, bebidas e derivados de carne (**Norton et al. 2008**). Novas aplicações surgiram no processamento de frutas e vegetais ao nível da alteração da atividade enzimática, abrindo a possibilidade de aumentar o seu tempo de vida de prateleira (**Terefe et al. 2014**).

1.1.1. Princípios operacionais da alta pressão

O HPP obedece a dois princípios fundamentais, o princípio de *Le Chatelier* e o princípio *isostático*. Segundo o princípio de *Le Chatelier*, que refere num sistema em equilíbrio, o efeito da pressão resulta num novo equilíbrio. Assim com o aumento da pressão um sistema tende a reduzir o volume e pode promover a inativação de microrganismos e de enzimas (**Smelt et al. 1998**). O segundo princípio indica que a pressão é transmitida de forma instantânea e uniforme por todo o produto independente da forma e do volume (**Yordanov et al. 2010**). Assim, os produtos alimentares são comprimidos sob pressão de forma uniforme em todas as direções, podendo retomar a sua forma inicial quando a aplicação da pressão cessar (**Smelt et al. 1998**), como se encontra representado no esquema da **Figura 1**. O aquecimento/arrefecimento adiabático caracteriza-se por uma variação da temperatura durante as fases de compressão/descompressão de forma instantânea nos alimentos sob pressão. Neste, a temperatura aumenta aproximadamente entre 3 a 9 °C por cada 100 MPa, este aumento varia de

acordo com a composição do alimento (Denys et al. 2000). Desta forma, este tipo de processamento apresenta uma vantagem relativamente aos tratamentos térmicos, devido à inexistência de um gradiente de temperatura, ou seja, a pressão atinge todo o produto de forma imediata e uniforme (Norton et al. 2008; Mújica et al. 2011).

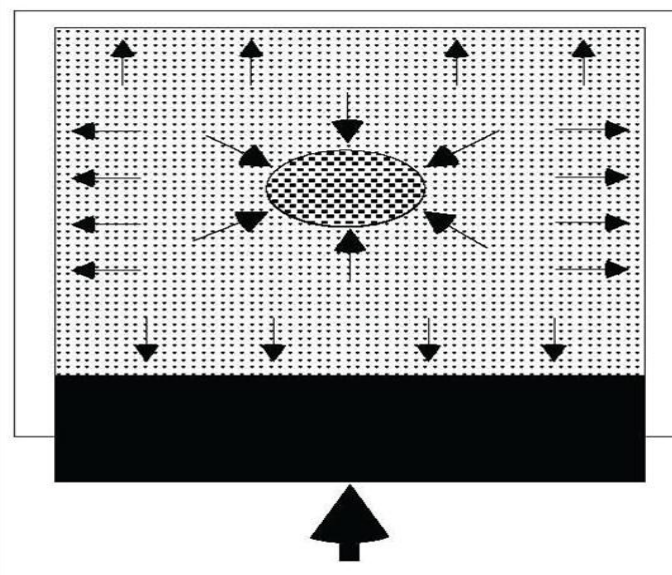


Figura 1. Esquema representativo do princípio isostático (Yordanov et al. 2010).

1.1.2. Descrição do processo

Os equipamentos industriais mais utilizados no processamento alimentar apresentam-se normalmente na forma de sistema *batch* (descontínuo). Os equipamentos industriais de processamento por alta pressão típicos são unidades compostas por uma câmara de pressão, um sistema de controlo de temperatura e pressão. O processamento inicia-se com a colocação do alimento embalado na câmara de pressão, este é sujeito a uma pressão, que é gerada e transmitida através de fluido (geralmente água), durante o tempo necessário, correspondendo à fase de compressão. Quando a pressão desejada é atingida, o bombeamento cessa, e de seguida o alimento fica a uma determinada pressão e temperatura um determinado tempo, iniciando-se a fase de descompressão, posteriormente o alimento é removido (Knorr et al. 2011).

1.2.1 Efeito da alta pressão sobre nos microrganismos

O HPP tem sido uma metodologia amplamente utilizada durante as ultimas décadas na conservação de alimentos devido à sua capacidade de inativar microrganismos vegetativos

patogénicos ou deteriorantes e enzimas (Heinz et al. 2010). O conhecimento dos efeitos biológicos da alta pressão na inativação dos microrganismos tornou possível utilizar o HPP como método de conservação a baixas temperaturas (Hugas et al. 2002; Norton et al. 2008). A inativação microbiana é a principal vantagem deste método e resulta de múltiplos danos intracelulares que comprometem a viabilidade do microrganismo. A resistência à inativação dos microrganismos aos tratamentos por alta pressão varia em função do tipo de microrganismo e da matriz do alimento (Hugas et al. 2002).

A eficácia da inativação por alta pressão depende dos efeitos sinérgicos da pressão e temperatura durante um determinado tempo de exposição (Heinz et al. 2010). O nível de pressão e tempo de exposição depende do produto alimentar utilizado e do resultado final pretendido. Na inativação enzimática é necessário utilizar níveis de pressões mais elevadas do que na inativação microbiana (San Martín et al. 2002).

Os efeitos da alta pressão de um modo geral caracterizam-se por uma redução do volume, seguida por alterações estruturais, morfológicas a nível celular e alterações das reações químicas em equilíbrio (Patterson et al. 2005). Os microrganismos quando expostos a altas pressões são inativados devido ao somatório dos danos estruturais e morfológicos que determinam a morte celular. Esses danos podem caracterizar-se por alterações na superfície da membrana celular como já verificado em *Listeria monocytogenes* quando sujeita a 400 MPa, por alterações na fluidez de proteínas membranares (Ritz et al. 2002) e alterações das funções fisiológicas das proteínas ou das enzimas (p. ex., na ATPase). É também possível observar-se alterações das funções ou dos componentes, tais como nos ribossomas ou nas suas subunidades e alterações ao nível do pH intracelular (Smelt et al. 2001; Knorr et al. 2011).

Em geral os efeitos da alta pressão são mais elevados nos microrganismos com maior grau de complexidade organizacional e estrutural. As células procarióticas têm maior resistência à pressão do que as células eucarióticas. Os microrganismos têm diferentes resistências à pressão, onde os esporos são os mais resistentes à pressão (Patterson et al. 2007). Nas células procarióticas, as bactérias Gram-positivas são mais resistentes à pressão do que as Gram-negativas, em que a diferença encontra-se na composição química da membrana celular e nas propriedades estruturais (Rendueles et al. 2011).

A inativação dos microrganismos vegetativos patogénicos tais como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* pode ser obtida pela aplicação de pressões próximas de 300 MPa combinado com temperaturas

moderadas (**Rendueles et al. 2011**). Nos microrganismos eucarióticos vegetativos, as leveduras e os bolores podem ser inativados em pressões compreendidas entre 200 a 300 MPa (**Smelt et al. 1998**). A aplicação de tratamentos com 300 MPa a 25 °C durante alguns minutos em formas vegetativas de bolores de *Byssoschlamys* spp. poderá inativá-los. Enquanto os esporos bacterianos e os ascósporos são mais resistentes à pressão. Os ascósporos podem ser inativados com a utilização de tratamentos com pressões mais elevadas, compreendidas entre 600 a 800 MPa a 70 °C durante 10 minutos (**Rastogi et al. 2007**). A inativação dos esporos bacterianos requer a aplicação de pressões mais elevadas (> 1200 MPa) (**Rastogi 2013**). Nos esporos de *Clostridium perfringens* Tipo A e *Clostridium sporogenes* a inativação pode ser conseguida com a aplicação de tratamentos de HPP que combinam pressões acima de 600 MPa e temperaturas superiores a 45 °C (**Paredes et al. 2007**).

1.2.2. Efeito da alta pressão nos constituintes dos produtos alimentares

Os tratamentos por alta pressão onde são utilizadas temperaturas moderadas ou altas estão associados a alimentos com elevada segurança alimentar. A percepção da qualidade nos alimentos não depende apenas da população microbiana mas também das reações bioquímicas, enzimáticas e das alterações estruturais (**Patterson 2005**). A maior parte das reações bioquímicas envolvidas nestas alterações resultam do aumento da pressão, sendo causadas seguidas por uma redução do volume (**Rastogi et al. 2007**) o que resulta na quebra das ligações não-covalentes (ligações de hidrogénio, iónicas e interações hidrofóbicas) responsáveis por manter as estruturas secundária, terciária e quaternária, encontradas nas proteínas (**Considine et al. 2008**). As ligações covalentes presentes na estrutura primária não são afetadas pela alta pressão (**Rendueles et al. 2011**). A desnaturação proteica depende das condições do tratamento (temperatura, pressão e tempo) podendo ser reversível se a pressão variar entre 100 a 300 MPa à temperatura ambiente e irreversível se as pressões forem superiores a 400 MP, seguida por inativação enzimática (**Knorr et al. 2011**), dependendo do tipo de proteína (**Rastogi et al. 2007**). A desnaturação da conformação proteica apresenta consequências a nível da atividade de certas enzimas podendo esta ser inibida, modificada, aumentada ou diminuída (**Rendueles et al. 2011**). No entanto a inativação de certas enzimas pode ser vantajosa na medida que pode reduzir ou atenuar a degradação da qualidade e manter o valor nutricional, das frutas ou vegetais nomeadamente das enzimas polifenoloxidasas (PPO) e lipoxigenases (LOX) (**Terefe et al. 2014**).

1.3 Armazenamento Hiperbárico

Os novos processos tecnológicos de conservação alimentar usados na indústria permitem a obtenção de alimentos saudáveis e microbiologicamente seguros (**Norton et al. 2008**), como anteriormente referido. No entanto, para assegurar a segurança e a qualidade durante o tempo do transporte e de armazenamento é necessário o uso de sistemas de refrigeração, que implicam gastos energéticos permanentes. Os sistemas de refrigeração são a forma mais comum de conservar os alimentos. Apesar da sua regular utilização, registam-se perdas em cerca de 10% dos produtos alimentares perecíveis. A nível da produção mundial, verifica-se um aumento do uso da refrigeração para reduzir as perdas pós-colheitas dos alimentos correspondendo a cerca de 30% (**Coulomb et al. 2008**). Os elevados custos de aquisição dos equipamentos de refrigeração e os elevados valores energéticos associados à conservação dos alimentos perecíveis têm vindo a aumentar consideravelmente. Esta situação tem um impacto negativo no aquecimento global e nas alterações climáticas que se tornam cada vez mais preocupantes (**James et al. 2010**).

Recentemente, o armazenamento hiperbárico (AH) tem sido reconhecido como um método de conservação alimentar com elevado potencial devido à possibilidade em reduzir os custos energéticos em comparação com a refrigeração (**Kalichevslff et al. 1995; Segovia et al. 2012**). Este método surgiu após terem sido encontrados alimentos em bom estado de conservação (caldo de carne, sanduíches e maçãs) no submarino Alvin que tinha afundado acidentalmente em 1968. Estes alimentos evidenciavam bom estado de conservação, depois de 10 meses a 1540 metros de profundidade (≈ 15 MPa) e expostos a temperaturas de 3 a 4 °C. Esta observação introduziu o conceito do AH, definido como um método de conservação alimentar sob pressão (**Jannasch et al. 1971**). Este método tem como objetivo principal, inibir o crescimento microbiano, reduzir a deterioração microbiana e aumentar o tempo de vida dos produtos alimentares em condições semelhante à refrigeração. O conhecimento do efeito inibitório do crescimento microbiano foi posteriormente avaliado por **Charm et al. (1977)** durante o armazenamento sob pressão em temperaturas de refrigeração. Estudos atuais referem a relevância do AH em alimentos altamente perecíveis tais como no sumo de morango (**Segovia et al. 2012; Bermejo et al. 2014**), sumo de melão (**Queirós et al. 2014**), sumo de melancia (**Fidalgo et al. 2013; Santos et al. 2014**), sopa de cenoura (**Moreira et al. 2015**), requeijão (**Duarte et al. 2014**) e fiambre fatiado (**Fernandes et al. 2015**).

1.3.1. Armazenamento hiperbárico a temperaturas de refrigeração

Este método de conservação de alimentos foi apresentado inicialmente por **Jannasch et al. (1972)**, a partir do bom estado de conservação dos alimentos encontrados no submarino Alvin. As potencialidades foram neste tipo de armazenamento posteriormente reconhecidas pela reduzida taxa de degradação da matéria orgânica armazenadas a 5300 m de profundidade durante 2-7 meses (3 °C) em comparação com as amostras controle mantidas à pressão atmosférica (0,1 MPa) (**Jannasch et al. 1971**).

Algum tempo depois **Mitsuda et al. (1972)** armazenaram, durante 1 ano, arroz, trigo e soja num lago a uma profundidade de 305 m (≈ 3 MPa) a temperaturas inferiores a 1 °C. Os resultados obtidos indicaram que alguns parâmetros bioquímicos, tais como humidade, ácidos gordos, vitamina B₁₂ e açúcares redutores, foram menos afetados nas amostras armazenadas em profundidade. Características como a capacidade germinativa, palatabilidade e qualidade de cozimento foram melhores nas amostras sob pressão, como também a capacidade redutora de alguns açúcares foram melhores em comparação com os grãos mantidos à 0,1 MPa e a 1 °C.

O conhecimento anterior do efeito da alta pressão combinado com baixas temperaturas no aumento do tempo de armazenamento dos alimentos serviu como ponto de partida para a introdução para uma nova forma de armazenamento de alimentos sob pressão utilizando temperaturas de refrigeração para aumentar a qualidade e tempo de validade de diversos produtos alimentares. Nesse sentido, **Charm et al. (1977)** avaliaram o crescimento microbiano de amostras de peixe armazenadas à pressão de 24 MPa a temperatura a 1 °C que permaneceram aceitáveis para consumo em comparação com as armazenadas à 0,1 MPa e à mesma temperatura durante 21 dias. Os autores referem a importância da inibição do crescimento microbiano em armazenamento a baixas temperaturas usando altas pressões de modo a melhorar a qualidade dos alimentos (**Charm et al. 1977**).

1.3.2. Armazenamento hiperbárico à temperatura ambiente

Uma das primeiras pesquisas com a utilização do AH à temperatura ambiente (25 °C) foi realizada por **Ko et al. (2001)** utilizando filetes de tilapia. As amostras de filetes foram colocadas em condições hiperbáricas durante 12 horas utilizando dois níveis de pressões diferentes, 101 e 203 MPa e a uma temperatura de 25 °C. Os resultados indicaram que as amostras colocadas a pressão de 203 MPa apresentavam-se mais frescas, com um valor K

(índice de frescura) superior ao das amostras colocadas a 101 MPa. Os mesmos autores também verificaram que amostras de filetes armazenadas a 203 MPa evidenciaram uma redução das contagens microbianas totais em relação ao valor inicial de 4,70 log UFC/g para cerca de 2 log UFC/g. Apesar disso as amostras armazenadas a 101 MPa conseguiram manter o valor inicial durante o tempo de armazenamento. Estes resultados indicaram a existência de um efeito inibitório do crescimento microbiano nas duas amostras a 101 MPa, mas este efeito foi mais acentuado a 203 MPa verificando-se uma diminuição da carga microbiológica (**Ko et al. 2001**). Na **Tabela 1** estão compilados os vários estudos científicos encontrados na literatura relativos ao AH à temperatura ambiente, onde podem ser observados os diversos parâmetros microbiológicos e físicos-químicos avaliados durante o AH e devidamente comparados com o armazenamento refrigerado.

Tabela 1. Exemplos de estudos de armazenamentos hiperbáricos à temperatura ambiente.

Produto	Parâmetro	Condições	Resultados	Referência
Filetes de Tilapia	Crescimento Microbiológico	101 MPa após 12 horas	Manutenção	Ko et al. 2001
		203 MPa após 12 horas	Redução	
Sumo de Morango	Crescimento Microbiológico	25, 100 e 220 MPa a 20 °C após 15 dias	Redução	Segovia et al. 2014
	Perda da Cor	25, 100 e 220 MPa a 20 °C após 15 dias	Atenuada	
	Viscosidade	25, 100 e 200 MPa a 20 °C após 15 dias	Atenuada	Bermejo et al. 2014
	Alteração do Perfil volátil	50 e 200 MPa a 20 °C após 15 dias	Atenuado	
Sumo de Melancia Fresco	Crescimento Microbiológico	75 MPa a 25 e 30 °C após 8 horas	Inibição	Santos et al. 2014
		100 e 150 MPa a 25 e 30 °C após 8 horas	Inibição e Inativação	
	Turbidez	100 MPa após 8 horas	Atenuada	Fidalgo et al. 2013
	Grau de acastanhamento	50, 75 e 150 MPa 25 °C 25, 50, 75 e 150 MPa a 30°C 100 MPa a 37 °C após 8 horas	Diminuiu	
	Crescimento Microbiológico	100 MPa a (18-21 °C) após 60 horas	Inibição	
	Perda da Cor	100 MPa a 30 °C após 8 horas	Diminuiu	
	Turbidez	100 MPa (18-21 °C) após 16 horas	Diminuiu	
	Grau de acastanhamento	100 MPa (18-21 °C) após 16, 24 e 60 horas	Diminuiu	
	Compostos fenólicos	100 MPa após 60 horas	Manteve-se	
Sumo de Melão Fresco	Crescimento Microbiológico	25 MPa a 30 ° após 8 horas	Crescimento	Queiros et al. 2014
		50 e 75 MPa a 25 e 30 °C após 8 horas	Inibição	
		100 e 150MPa a 25,30 e 37°C após 8 horas	Inativação	
	Turbidez	50 MPa a 25 °C após 8 horas	Aumento	
	°Brix	Ao longo do armazenamento hiperbárico após 8 horas	Manteve-se	
Requeijão	Crescimento Microbiológico	100 MPa a 25 e 30 °C após 8 horas	Inibição	Duarte et al. 2014
		100 MPa a 37 °C 150 MPa a 30°C após 8 horas	Inativação	
	Perda da Cor	100 MPa a 37 °C após 4 horas 150 MPa a 25 °C após 8 horas	Alterada	
	Oxidação Lipídica	100 MPa a 25 °C após 8 horas	Elevada	
Sopa de Cenoura	Crescimento Microbiológico	100 MPa 25 e 30 °C após 8 horas	Inibição	Moereira et al. 2015
		100 MPa a 30 °C e 150 MPa a 25 °C após 8 horas	Inativação	
	Perda da Cor	100 MPa a 25 °C após 4 horas 100 MPa a 30 °C após 8 horas	Diminuição	
	Açúcares Redutores	100 MPa a 30 °C após 8 horas	Aumento da concentração	
Fiambre Fatiado	Crescimento Microbiológico	100 MPa a 30 °C após 8 horas	Inibição	Fernandes et al. 2015
		100 a 30 e 37 °C 150 MPa a 30 °C após 8 horas	Inativação	
	Perda da Cor	25, 50, 100 e 150 MPa a 25, 30 e 37 °C após 4 e 8 horas	Não ocorreu alterações	
	Oxidação Lipídica	100 MPa a 30 °C após 8 horas	Aumentou	

Atualmente, outros autores comprovam o efeito inibitório no sumo de morango quando foi sujeito a AH à temperatura ambiente. Neste estudo **Segovia et al. (2012)** comparou o armazenamento em diferentes condições de pressão (25, 100 e 220 MPa) à temperatura controlada de 20 °C em amostras de sumo de morango fresco durante 15 dias, comparando com amostras armazenadas à 0,1 MPa e 5 °C (refrigeradas). Os resultados indicaram uma diminuição da carga microbiana nos mesófilos aeróbios totais e nos bolores e leveduras em relação aos valores iniciais nas amostras armazenadas sob pressão em comparação com as refrigeradas. Estes resultados indicaram a existência de um efeito inibitório do crescimento microbiológico nas amostras sob pressão em comparação com as amostras armazenadas sob refrigeração (**Segovia et al. 2012**).

O mesmo efeito inibitório do crescimento microbiano também foi observado por **Santos et al. (2014)** em amostras do sumo de melancia quando armazenadas a pressões entre 50 e 150 MPa e temperaturas de 25 a 37 °C durante 8 horas e comparadas com amostras refrigeradas (0,1 MPa e a 4 °C), como se pode verificar na **Figura 2**. Neste estudo foi verificado uma redução da carga microbiana a 50 MPa em relação a carga inicial nos mesófilos e *Enterobacteriaceae* em comparação com as amostras controlo, mas sem variação nos bolores e leveduras. Utilizando pressões de 100 e 150 MPa verificou-se uma redução da carga microbiana mais acentuada (inativação microbiana), em relação às amostras refrigeradas. À pressão de 75 MPa foi possível obter-se um efeito inibitório do crescimento microbiano nos mesófilos aeróbicos totais, *Enterobacteriaceae*, e bolores e leveduras independente da temperatura sendo equivalente ao armazenamento refrigerado (**Santos et al. 2014**).

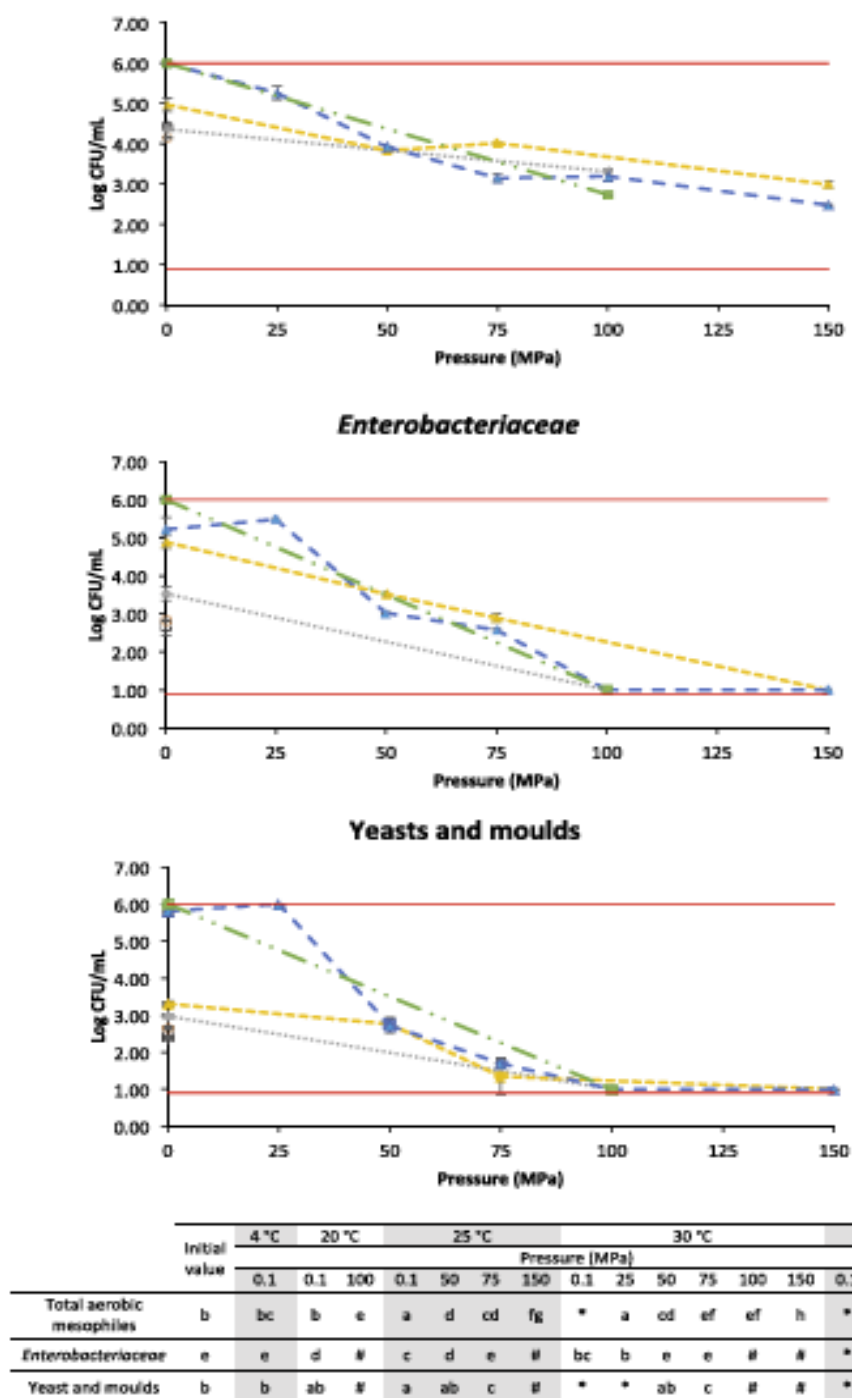


Figura 2. Avaliação microbiológica de mesófilos aeróbios totais, *Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras (expressos em Log UFC/mL) no sumo de melancia inicial e depois de 8 horas armazenados em diferentes condições de pressão (25, 50, 75, 100 e 150 MPa) e temperatura. Os valores acima de 6.00 e abaixo de 1 Log unidades respetivamente (-). As diferentes letras entre pressão/temperatura (a-h) indicam diferenças significativas ($p < 0.05$), * e # são indicativo de valores superiores de 6 e inferiores de 1 Log UFC/mL, respetivamente. Adaptado de Santos et al. (2014a)

Comportamentos semelhantes relativamente ao crescimento microbiano foram posteriormente obtidos utilizando sumo de melão (Queirós et al. 2014), sopa de cenoura

(Moreira et al. 2015) e requeijão (Duarte et al. 2014). No sumo de melão fresco verificou-se um efeito inibitório do crescimento microbiano nos mesófilos aeróbios totais, *Enterobacteriaceae*, e bolores e leveduras em pressões compreendidas entre 50 a 75 MPa a diferentes temperaturas em comparação com o armazenamento refrigerado durante 8 horas (Queirós et al. 2014). Em fiambre fatiado este efeito inibitório do crescimento microbiológico foi verificado em níveis de pressão superiores a 50 MPa (Fernandes et al. 2015). Enquanto na sopa de cenoura e no requeijão este efeito foi verificado a uma pressão de 100 MPa durante 4 e 8 horas, como indicado na Figura 3 (Moreira et al. 2015).

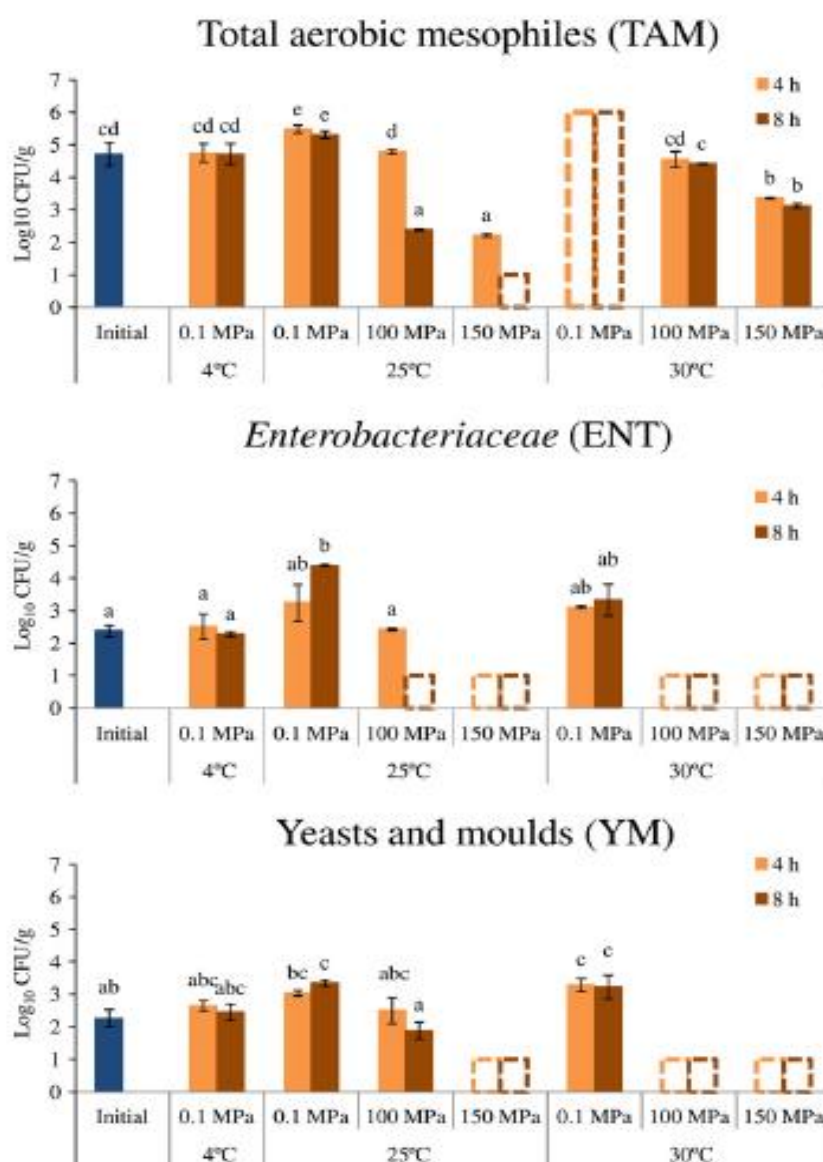


Figura 3. Avaliação microbiológica de mesofilos aeróbios totais, *Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras (expressos em log₁₀ UFC/mL) iniciais e depois do armazenamento hiperbárico da sopa de cenoura em diferentes condições de pressão (100 e 150 MPa) e temperatura (e 25 °C e 30°C) durante 4 e 8 horas. Condições do armazenamento do controlo (4°C, 0,1 MPa). Os valores 6 e 1 log unidades (barras a tracejado), correspondem a

valores superiores a 6 unidades de log e inferiores a 1 unidade log respectivamente. Adaptado de **Moreira et al. (2015)**.

Noutro estudo foi igualmente demonstrado este efeito inibitório das bactérias ácido-láticas no requeijão, com exceção dos armazenamentos a 25 °C (100 e 150 MPa) durante 4 horas (**Duarte et al. 2014**). Nestes estudos, o uso de pressões compreendidas entre 100 e 150 MPa levaram à diminuição da carga microbiana para valores inferiores ao inicial, indicando assim que para além da inibição do crescimento microbiológico também houve uma redução/inativação dos microrganismos presentes. Segundo estes autores o efeito inibitório do crescimento microbiano é independente da temperatura ambiente em condições hiperbáricas (**Queirós et al. 2014; Moreira et al. 2015; Fernandes et al. 2015**)

Resultados semelhantes foram observados por **Fidalgo et al. (2013)** no AH à temperatura ambiente não controlada (18-21 °C) durante 60 horas à pressão de 100 MPa utilizando sumo de melancia. Neste valor de pressão os resultados indicaram uma redução da carga microbiana em comparação com os resultados do armazenamento a 0,1 MPa a 5 °C (**Figura 4**). Em concordância com estes resultados, o sumo de melancia no fim do tempo de armazenamento ainda exibiu um aroma fresco característico do sumo (**Fidalgo et al. 2013**).

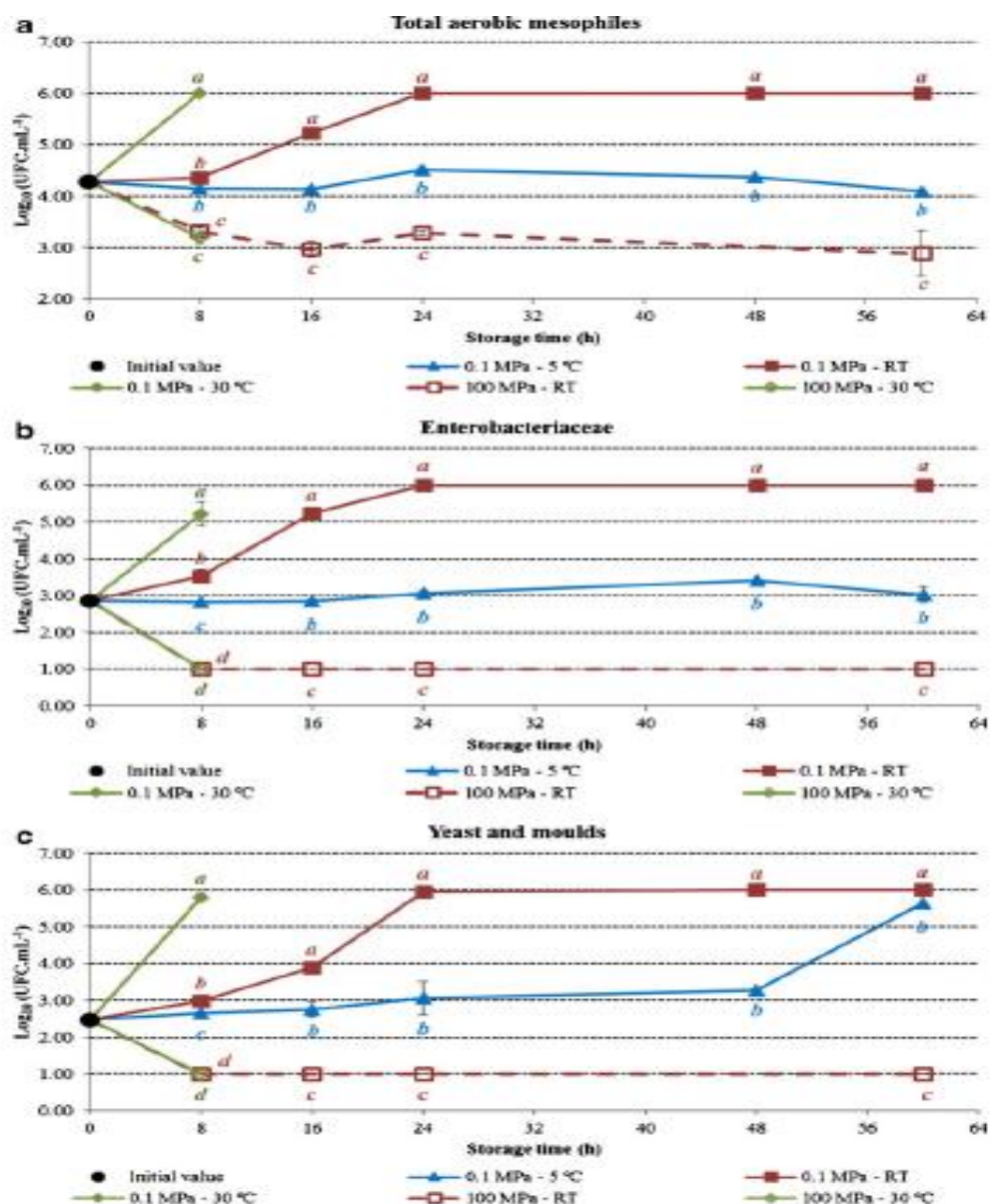


Figura 4. Avaliação microbiológica de mesófilos aeróbios totais (a), *Enterobacteriaceae* (b), bolores e leveduras (c) no sumo de melancia (expressos em \log_{10} UFC/mL) inicial e no armazenamento durante 8, 16, 24, 48 e 60 horas em diferentes condições de pressão (0,1 e 100 MPa) e temperatura Adaptado de Fidalgo et al. (2013).

1.3.2.1. Efeito do armazenamento hiperbárico à temperatura ambiente nos parâmetros físicos-químicos

Como anteriormente referido, a eficácia do tratamento na inativação microbiológica depende de vários fatores, entre os quais, da pressão aplicada, do tempo de exposição, do microrganismo, do tipo de alimento, e de parâmetros físicos-químicos, tais como a temperatura, pH, entre outros (Téllez et al. 2001; Rendueles et al. 2011). Os efeitos da pressão observados no AH não se restringem apenas à ação microbiológica mas também aos factores físicos-

químicos e bioquímicos responsáveis pela degradação alimentar (**Prada et al. 2014**). Em diferentes estudos foram avaliados diversos parâmetros físicos-químicos tais como o pH, acidez titulável, grau de acastanhamento, turbidez, viscosidade, compostos fenólicos, teor de sólidos solúveis (°Brix), cor, oxidação lipídica e açúcares redutores, utilizados para avaliar o estado de degradação em diferentes alimentos perecíveis.

No estudo realizado por **Queirós et al. (2014)**, o pH foi avaliado no sumo de melão em diferentes condições de pressão e temperatura durante 8 horas no AH à temperatura ambiente. Os resultados obtidos indicaram que o valor do pH do sumo não foi afetado significativamente em relação ao valor inicial ($5,71 \pm 0,01$), ao contrário do sumo armazenado à pressão atmosférica, que aumentou ($5,80 \pm 0,10$) nas temperaturas de 4 e 25 °C (**Queirós et al. 2014**). Resultados similares foram identificados no sumo de melancia, onde as amostras do AH durante 8 horas apresentaram de um modo geral valores de pH inferiores ou similares ao valor inicial em comparação com as amostras da pressão atmosférica, com exceção das amostras armazenadas a 37 °C (**Santos et al. 2014**). No sumo de melancia, o AH demonstrou ser favorável mesmo quando avaliado em amostras expostas a pressões de 100 MPa à temperatura ambiente armazenadas durante 60 horas, o valor do pH deste sumo obtido foi inferior no armazenado à pressão atmosférica comparativamente ao valor inicial (**Fidalgo et al. 2013**).

Os resultados obtidos para as amostras de sopa de cenoura e de requeijão foram semelhantes. No caso da sopa de cenoura, as amostras armazenadas à pressão de 100 MPa (a 25 e 30 °C) obtiveram um valor de pH inferior ao valor inicial durante as 4 e 8 horas em comparação com as amostras refrigeradas (0,1 MPa a 4 °C), mas foram encontradas exceções nas amostras armazenadas a 0,1 MPa a 30 °C (**Moreira et al. 2015**). Enquanto no requeijão o valor do pH foi inferior ao valor inicial nas amostras armazenadas à pressão atmosférica e armazenadas a 150 MPa (25°C) depois de 8 horas (**Duarte et al. 2014**). No entanto, noutro estudo com amostras de fiambre fatiado o valor de pH não variou significativamente entre o armazenamento refrigerado e sob pressão (25-150 MPa) em relação ao valor inicial (**Fernandes et al. 2015**).

Nas amostras do sumo de melão fresco a acidez titulável aumentou à medida que aumentava a pressão e a temperatura ao longo das 8 horas (**Queirós et al. 2014**). No sumo de melancia não se encontraram diferenças significativas entre o armazenamento sob refrigeração e pressão, durante as 8 horas, com exceção das amostras armazenadas sob pressão atmosférica e à temperatura de 37 °C que registaram o valor máximo de acidez titulável (**Santos et al.**

2014). Outros autores verificaram que no AH a 100 MPa à temperatura ambiente a variação da acidez titulável pode ser atenuada durante 60 horas em comparação com as amostras armazenadas a 0,1 MPa à mesma temperatura (**Fidalgo et al. 2013**). Segundo **Moreira et al. (2015)**, a variação da acidez titulável de sopa de cenoura atenuou a 100 MPa (25 e 30°C) depois de 4 horas, sendo os valores obtidos semelhantes ao armazenamento refrigerado, mas inferiores a 150 MPa (25 °C). Estes resultados indicaram que o AH atenuou a acidez titulável nas amostras de sopa de cenoura de forma semelhante ou melhor em comparação com o armazenamento refrigerado (**Moreira et al. 2015**).

O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi estudado nos sumos de melancia e melão frescos, como forma de medir a variação da quantidade de açúcares totais presente ao longo do AH. Segundo **Santos et al (2014)**, o valor do teor de sólidos solúveis aumentou ligeiramente nas amostras do sumo de melancia armazenadas à pressão atmosférica às temperaturas de 4 e 25 °C e nas pressões de 50 e 100 MPa (a 20 °C), mas obtiveram-se também valores inferiores ao inicial nas amostras de 20 °C (0,1 e 100 MPa), 25 °C (75 MPa) e 37 °C (0,1 e 100 MPa) ao fim de 8 horas. Nas amostras restantes armazenadas por períodos de tempo de 8 horas e 60 horas o valor de teor dos sólidos solúveis obtido foi similar ao valor inicial (**Fidalgo et al. 2013**). No caso de sumo de melão fresco armazenado sob pressão apresentou um aumento do valor de teor de sólidos solúveis durante 8 horas, ao contrário do valor do armazenado à pressão atmosférica (**Queirós et al. 2014**).

No sumo de melancia o grau de acastanhamento diminuiu nas amostras colocadas em AH (100 MPa à temperatura ambiente durante as 60 horas) em relação ao armazenamento refrigerado e ao valor inicial (**Fidalgo et al. 2013**). Esta diminuição do grau de acastanhamento também foi verificada por **Santos et al. (2014)** em sumo de melancia, com exceção das amostras a 100 MPa (a 20 °C) depois de 8 horas. No sumo de melão fresco também se verificou um aumento do grau de acastanhamento, mas à medida que a pressão utilizada aumentava o valor grau de acastanhamento também aumentava, atingido o seu valor máximo a 100 MPa (37 °C). Estes resultados indicaram que o AH pode aumentar o grau de acastanhamento em comparação com as amostras armazenadas refrigeradas dependendo do valor da pressão (**Queirós et al. 2014**).

No AH de sumo de melão fresco verificou-se um aumento da turbidez, com exceção das amostras sujeitas à pressão de 50 MPa (25 °C) em comparação com as amostras refrigeradas (**Queirós et al. 2014**). De igual forma o sumo de melancia armazenado durante 60 horas em

condições hiperbáricas apresentaram uma turbidez superior em relação ao armazenamento refrigerado (**Fidalgo et al. 2013**).

A viscosidade foi avaliada por **Segovia et al. (2012)** no sumo de morango fresco. Este sumo depois de 15 dias armazenado a 20 °C evidenciou uma menor perda da viscosidade com pressões de 25, 100 e 200 MPa em comparação com as amostras armazenadas na pressão atmosférica e 5 °C (refrigeração). Estes resultados indicaram que a pressão utilizada no AH conseguiu atenuar a perda da viscosidade no sumo de morango (**Segovia et al. 2012**). A menor perda de viscosidade nas amostras de sumo de morango fresco armazenadas sob pressão pode estar relacionada com o efeito da pressão na atividade enzimática. A pressão exercida nas enzimas de alguns frutos e vegetais pode induzir alterações na conformação estrutural podendo contribuir para a inativação parcial ou completa de enzimas. As enzimas mais relevantes são a pectina metilesterase (PME), poligalacturonase (PG) e polifenoloxidasas (PPO), responsáveis pela degradação da parede celular podendo contribuir para a redução da viscosidade. As alterações na atividade destas enzimas também podem levar à sedimentação, perda da turbidez e de cor (**Sun et al. 2005**).

A cor é um atributo da qualidade organolética e nutricional dos sumos de frutas e vegetais determinante para a escolha dos consumidores. Segundo **Bermejo et al. (2012)** e com base na literatura, os mecanismos de degradação intrínseca da cor do sumo de morango fresco dependem de vários factores, tais como o pH, a concentração e estrutura das antocianinas, a presença de outros compostos fenólicos, flavonoides, de iões metálicos, ácido *L*-ascórbico, enzimas, entre e outros. A presença de oxigénio, o tempo, a temperatura e outros factores influenciam as condições de armazenamento. O efeito da pressão foi avaliado na degradação da cor em diferentes sumos depois de serem sujeitos ao AH. **Segovia et al. (2012)** avaliou a cor foi em amostras de sumo de morango sob AH durante 15 dias a 20 °C. Estes autores verificaram que a perda de cor foi atenuada nas amostras colocadas em condições hiperbáricas em comparação com a cor das amostras do armazenamento à pressão atmosférica (e a 5 °C) (**Segovia et al. 2012**). Resultados similares foram obtidos nas amostras da sopa de cenoura armazenadas a 100 MPa e a 25 e 30 °C durante 4 e 8 horas, com exceção a 150 MPa e a 30 °C (**Moreira et al. 2015**). Enquanto em amostras de requeijão, o AH apresentou maiores diferenças ao nível da cor a 100 MPa e a 37 °C (4 horas) e 150 MPa e a 25 °C (8 horas) em comparação com as amostras do armazenamento refrigerado (**Duarte et al. 2014**). Em amostras de fiambre fatiado não foram observadas diferenças significativas na alteração da cor durante o

AH nos diversos níveis de pressão (25, 50, 100 e 150 MPa) e de temperaturas (25, 30 e 37 °C) em relação ao armazenamento refrigerado durante as 4 e 8 horas (**Fernandes et al. 2015**). Por sua vez em sumo de melancia os resultados do AH indicaram que as amostras sujeitas a 100 MPa apresentaram maior alteração na cor à temperatura ambiente em comparação com as armazenadas à pressão atmosférica a 5 °C, com exceção das armazenadas durante as 8 horas a 30 °C (**Fidalgo et al. 2013**). Alguns autores defendem que um dos principais mecanismos responsáveis pela alteração da cor nos frutos e vegetais pode resultar do acastanhamento enzimático. As enzimas peroxidase (POD), PPO, anthocyanina- β -glucosidase, chlorophyllase e β -galatoxidase podem estar envolvidas na degradação dos compostos fenólicos, antocianinas, clorofilas durante o armazenamento (**Prada et al. 2014; Terefe et al. 2014**) e assim provocar alteração na cor. No entanto, **Fidalgo et al. (2013)** não encontraram diferenças significativas nas amostras a 100 MPa ao nível dos compostos fenólicos durante o AH e durante o armazenamento refrigerado depois de 60 horas.

O requeijão e o fiambre fatiado possuem elevado conteúdo lipídico. Nas amostras de requeijão observou-se que a oxidação lipídica no AH durante 8 horas foi superior a 100 MPa em comparação com as do armazenamento refrigerado (**Duarte et al. 2014**). No fiambre fatiado, os resultados indicaram que as amostras armazenadas a 100 MPa (30 °C) durante 8 horas apresentaram uma oxidação lipídica superior quando comparadas com as amostras refrigeradas (**Fernandes et al. 2015**). Em relação aos açúcares redutores observados na sopa de cenoura, os resultados indicaram um aumento da concentração nas amostras armazenadas a 0,1 MPa (30 °C) e 100 MPa (30 °C) em comparação com as amostras do armazenamento refrigerado depois de 8 horas. O aumento registado nas amostras da pressão atmosférica pode dever-se à elevada atividade microbiana, resultando na hidrólise de amido (proveniente da batata) contribuindo assim para o aumento de açúcares livres para serem usados pelos microrganismos (**Moreira et al. 2015**).

Noutro estudo realizado de AH à temperatura ambiente foi avaliado o efeito de diferentes pressões (50 e 200 MPa) a 20 °C no perfil volátil do sumo de morango armazenado durante 15 dias e comparado com o armazenamento refrigerado (5 °C a 0,1 MPa). Segundo **Bermejo et al. (2014)** o perfil volátil do sumo de morango varia em função do método de conservação usado. Neste sentido identificaram os compostos voláteis característicos de sumo de morango inicialmente (trans-2-hexenal, acetato de metilo, butanoate de metilo e hexanal+ butanoate de etilo). Após 15 dias de armazenamento os autores verificaram que estes compostos variam nos

dois tipos de armazenamento (AH e refrigeração). Os resultados indicaram que o 1-hexanal aumentou no armazenamento refrigerado em comparação com os compostos característicos do sumo fresco (hexanal+butanoato de etilo, trans-2-hexenil-acetato, acetato de benzilo, nerolidol, hexanoato de metilo), que diminuíram no fim do período de armazenamento como se pode observar na **Figura 5**. O aumento do 1-hexanal pode estar relacionado com a atividade da álcool desidrogenase, o que por sua vez pode explicar a reduzida abundância do hexanal+etil butanoato. A redução da presença de trans-2-hexenil-acetato e de nerolidol no armazenamento refrigerado pode afectar o aroma do sumo, por serem considerados os compostos característicos do aroma do sumo de morango típico utilizados para a avaliação sensorial.

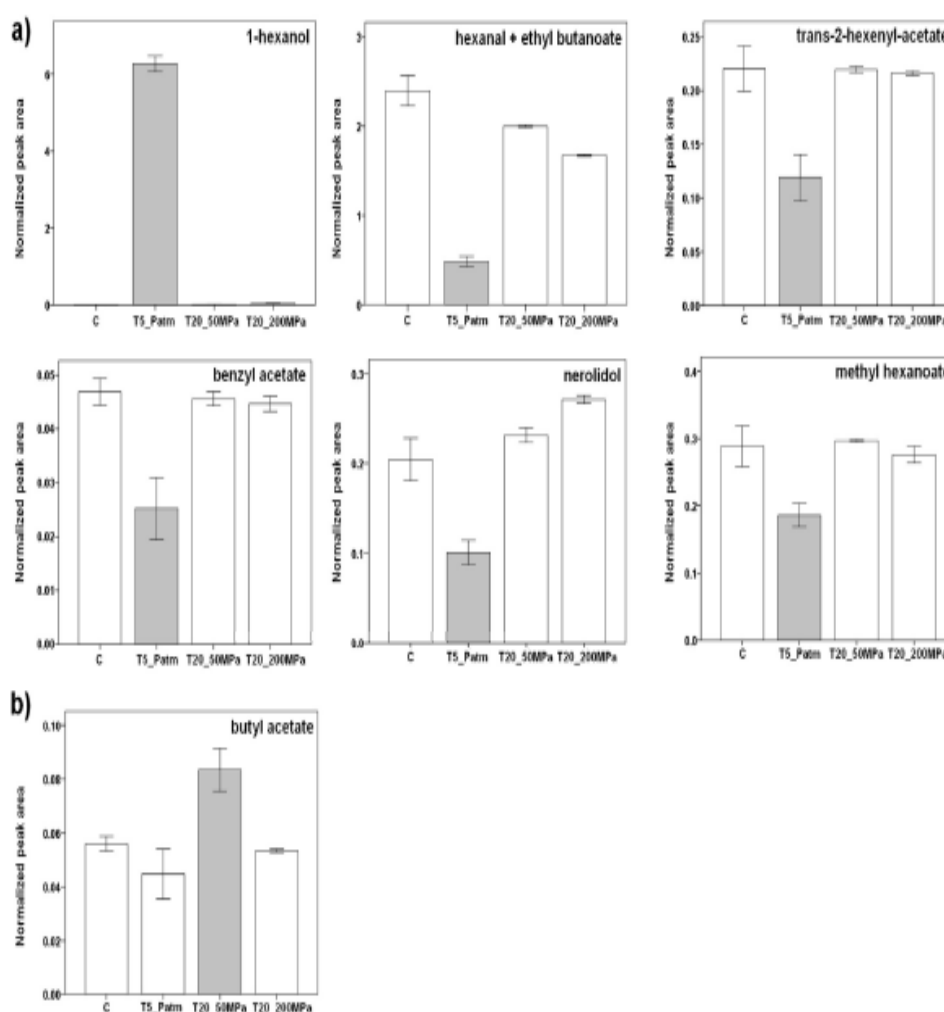


Figura 5. Composição volátil das amostras do sumo de morango armazenado em diferentes condições de pressão: a) Amostras a T_5°C a pressão atmosférica e b) Amostras a T_20°C a 50 MPa. MPa). Adaptado de **Bremejo et al. (2014)**.

Em oposição, as amostras do AH a 20 °C registaram menores alterações nestes compostos em comparação com o armazenamento refrigerado. No AH os compostos furan-2-

metil acetato, trans-2-hexenil-acetato e 2,4-hexadienal diminuíram. Apesar disso, estes aldeídos C₆ apresentaram-se com maior abundância nas amostras de 50 e 200 MPa a 20 °C em relação às amostras do armazenamento refrigerado depois de 15 dias. A abundância destes aldeídos C₆ pode estar relacionada com o aumento da sua formação devido à pressão ou atividade limitada da álcool desidrogenase durante o AH. Esta enzima converte os aldeídos C₆ nos seus derivados, mas quando se encontra sob pressão apresenta baixa atividade. O norelidol apresenta níveis mais elevados nas amostras armazenadas a 200 MPa a 20 °C que pode estar relacionado com a elevada atividade enzimática da β-glucosidade. Esta enzima é responsável pela libertação de compostos voláteis, em que a sua atividade aumenta quando exposta a pressões compreendidas entre 200 e 400 MPa, podendo ser uma possível explicação para o seu aumento nas amostras do AH. A partir destes resultados é possível referir que sumo de morango armazenado sob pressão e a 20 °C depois de 15 dias conseguem manter uma melhor composição em compostos característicos do aroma de sumo de morango inicial em comparação com o armazenamento refrigerado (Bermejo et al. 2014).

1.3.3. Armazenamento pós-hiperbárico

Em alguns estudos os diferentes produtos alimentares armazenados sob pressão foram avaliados na sua estabilidade em condições não hiperbáricas à pressão atmosférica e refrigeração, denominando-se de armazenamento pós-hiperbárico.

Sumo de morango previamente armazenado sob pressão foi mantido durante 15 dias a 0.1 MPa e a 5 °C, verificando-se que nestas amostras a carga microbiológica manteve-se constante, assistindo-se assim a um efeito inibitório do crescimento microbiológico após AH e em condições de refrigeração. Além disso conseguiu-se uma boa estabilidade da viscosidade e da cor, permanecendo estáveis após os 15 dias adicionais (Segovia et al. 2012).

No caso de sumo de melancia, amostras armazenadas a 100 MPa foram colocadas em refrigeração durante 7 dias, cujos resultados obtidos indicaram também uma manutenção da carga em mesófilos aeróbios totais e *Enterobacteriaceae*, com exceção dos bolores e leveduras que aumentou para valores entre <1 e 3,57 Log UFC/mL (Fidalgo et al. 2013).

1.4 Caso de Estudo – Sumo de Melancia

Atualmente a Europa representa o segundo maior mercado do mundo de exportação de sumos de frutas, no entanto é o maior mercado de importações (Anom et al. 2013).

Nas últimas décadas os europeus têm mostrado um crescente interesse em consumir sumos de frutas e adquirir hábitos de vida saudável. O consumo de sumos de frutas e de vegetais é reconhecido como um hábito de alimentação saudável devido aos seus benefícios nutricionais amplamente estudados. Estudos epidemiológicos referem os frutos e vegetais como fontes de um elevado número de componentes fitoquímicos tais como vitaminas, minerais, fibras, carotenóides, compostos fenólicos, aos quais estão associados a potenciais capacidades benéficas para a saúde (Gardner et al. 2000; Paterson et al. 2006). Apesar das suas potencialidades o consumo de sumos de fruta e de vegetais estão na origem de várias intoxicações alimentares devido ao crescimento de microrganismos patogénicos (Aneja et al. 2014). A microflora das frutas é na sua maioritária composta por bactérias pertencente ao género *Acetobacter*, *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Saccharobacter*, *Zymomonas*, e *Zymobacter* e *Enterobacter*. Identificando-se também a presença de leveduras devido à sua elevada tolerância à acidez pertencentes ao género *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces* e *Rhodotorula*, sendo as mais envolvidas na degradação dos sumos, bem como a presença de bolores tais como o *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Eurotium spp.*, *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.*, *Paecilomyces spp.*, e *Botrytis spp* (Bevilacqua et al. 2011).

A melancia (*Citrulus lanatus*) é um fruto originário das regiões tropicais de África. Atualmente ocupa um lugar de destaque no mercado internacional de frutos e vegetais em tudo o mundo (FAO 2012). O sumo de melancia é uma bebida exótica de cor vermelha muito atrativa para os consumidores (Aguiló et al. 2010a). É uma fonte rica em compostos fitoquímicos tais como licopeno, caratenóides, e vitaminas C, A e E (Gardner et al. 2000). Contem também sais minerais, designadamente potássio, magnésio, cálcio e ferro e compostos fenólicos, contendo fortes propriedades benéficas para a saúde (Rawson et al. 2011). A composição nutricional deste sumo é na sua maioria composta por 93% de água e por 7% de macronutrientes, vitaminas e minerais (Almeida et al 2003), como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2.Composição nutricional por 100 g de melancia. Adaptado de Almeida (2003).

Composição Nutricional			
	Vitaminas (100g)		Minerais (100g)
Água (93 %)	Vitamina A	590 (IU)	Cálcio (7 mg)
Hidratos de Carbono (6,4 %)	Ácido Ascórbico	(7 mg)	Fósforo (1,0 mg)
Proteína (0,5 %)	Ácido Pantoténico	(0,3 mg)	Sódio (1 mg)
Fibra (0,3 %)	Niacina	(0,2 mg)	Potássio (100 mg)
Vitaminas (0,2 %)	Vitamina B6	(0,07 mg)	Magnésio (10,2 mg)
	Tiamina	(0,03 mg)	Ferro (0,5 mg)
	Riboflavina	(0,03 mg)	Zinco (0,09 mg)
	Ácido fólico	(8µg)	Cobre (0,02 mg)
	Biotina	(3,6 µg)	

No entanto, o sumo de melancia devido à sua elevada atividade da água (0,97-0,99) e baixa acidez (pH 5,2-6,7) é considerado um alimento altamente perecível, permitindo o crescimento de microrganismos degradativos e patogénicos (**Mosqueda et al. 2008**). As infeções alimentares associadas ao consumo de sumo de melancia resultam na ocorrência de microrganismos patogénicos tais como *Listeria monocytogenes* (**Penteado et al. 2004**), *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* spp. (**Sharma et al. 2005**). A presença destes microrganismos resulta da contaminação do fruto durante a etapa de colheita e de manuseamento (**Sharma et al. 2005**).

No sentido de evitar o crescimento microbiano são utilizados tratamentos térmicos para manter a qualidade e segurança alimentar dos sumos, batidos e outros produtos. Estes tratamentos térmicos tradicionais regularmente usados diminuem o risco microbiológico dos sumos e a incidência de infeções alimentares. No entanto, após tratamento térmico perdem a sua qualidade organolética e nutricional tanto desejada pelos consumidores..Novos métodos não-térmicos de conservação dos sumos de frutos comercializados conseguem reduzir a perda destas propriedades físico-químicas e organoléticas, demonstrando grande potencialidade na indústria dos sumos de fruta (**Aneja et al. 2014**).

Atualmente a refrigeração é considerada um dos métodos de conservação mais utilizados, assegurando a segurança a qualidade dos produtos durante algum tempo, prevenindo a ocorrência de infeções alimentares (**Coulomb et al. 2008**). No entanto a refrigeração apresenta elevados custos económicos, sendo por isso necessário encontrar formas alternativas de conservação de alimentos (**Coulomb et al. 2008**). Desta forma o AH à temperatura ambiente, surge como novo método de conservação alimentar, como foi indicado e demonstrado anteriormente nos diversos estudos realizados. Neste sentido este método demonstrou ter

elevado potencial na conservação alimentar podendo ser considerado como alternativo ao armazenamento refrigerado, devido à sua possibilidade de reduzir custos energéticos. Este método apresenta vantagem energética relativamente aos outros métodos, devido ao potencial redução de energia nas fases de compressão e descompressão do equipamento, não sendo necessário o fornecimento de energia extra para o controlo de temperatura. Com base nos estudos anteriores, onde foi possível conservar sumo de melancia com a utilização de pressões compreendidas entre 75 e 100 MPa num AH durante 8 horas, seria importante estudar o AH à temperatura ambiente deste mesmo produto alimentar utilizando tempos de armazenamento superiores como forma de determinar o tempo de prateleira do alimento em condições hiperbáricas, sempre comparando com armazenamento sob refrigeração.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho consistiu em verificar o efeito do AH em sumo de melancia tentando validar a sua viabilidade como nova metodologia de armazenamento. Foi estudada a possibilidade de existência de um aumento do prazo de validade deste produto em AH, assegurando a qualidade microbiológica, a estabilidade de parâmetros físico-químicos e bioquímicos, em comparação com o mesmo sumo de melancia quando armazenado a 0,1 MPa sob refrigeração e à temperatura ambiente. Neste trabalho foram utilizadas pressões de 50, 75 e 100 MPa durante 10 dias, sendo os resultados posteriormente comparados com o armazenamento refrigerado (0,1 MPa a 4 °C) e armazenamento à temperatura ambiente (0,1 MPa a ≈ 21 °C).

Num segundo estudo, antes de um AH a 50 MPa/ ≈ 21 °C durante 75 dias, sumo de melancia foi pasteurizado por alta pressão a 600 MPa, à temperatura ambiente, durante 6 minutos, sendo embalado contendo a) ar no interior da embalagem e b) sem ar no interior da embalagem, com a finalidade de potenciar o de crescimento de microrganismos e de desenvolvimento de oxidações. Ao longo do tempo estas amostras foram sendo comparadas com outras às seguintes condições: 0,1 MPa/ ≈ 21 °C e 0,1 MPa/4 °C. Com este estudo pretendeu-se inativar os microrganismos vegetativos, deixando apenas os esporos existentes de forma a verificar eventuais implicações do AH nos mesmos.

Os parâmetros estudados foram:

1. Microbiológicos:

Microrganismos analisados: Mesófilos aeróbicos totais (MAT), psicrófilos aeróbicos totais (PAT), *Enterobacteriaceae* (ENT), e bolores e leveduras (BL);

Microrganismos inoculados: *Listeria innocua* (ATCC 33090); *Escherichia coli* (ATCC 33090);

2. Físico-químicos: pH, cor, turbidez, grau de escurecimento, acidez titulável, sólidos solúveis totais (°Brix, TSS), licopeno e compostos fenólicos;

3. Bioquímicos: Atividade da pectina metilesterase (PME), polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1. Preparação do sumo de melancia

A melancia (*Citrullus lanatus*) foi comprada num supermercado em bom estado de maturação e mantida a uma temperatura de 4 °C antes de ser lavada, descascada e esmagada, até se obter o sumo. Este foi filtrado através de tecido de algodão esterilizado com a finalidade de formar uma solução homogénea sem as sementes. O sumo fresco preparado foi devidamente armazenado a -80 °C, sendo posteriormente descongelado a 4 °C aquando da realização dos ensaios. Em cada ensaio, o sumo foi doseado assepticamente em diferentes alíquotas de 10 mL, em sacos de baixa permeabilidade previamente esterilizados por UV durante 15 min (PA/PE-90, Albipack - Soluções de embalagem, Águeda, Portugal), utilizando uma câmara de fluxo laminar (Biological Safety Cabinet Telstar Bio II Advance, Terrassa, Espanha), com o objetivo de evitar contaminações. Todos os sacos de sumo foram selados termicamente de forma manual de modo a garantir uniformidade do volume de ar no interior das embalagens.

3.2. Condições de armazenamento

Inicialmente o sumo de melancia fresco foi armazenado em diferentes condições durante vários dias (0, 4, 7 e 10 dias): (i) sob refrigeração (4 °C) e à pressão atmosférica (0,1 MPa); (ii) temperatura ambiente (≈ 21 °C) e à pressão atmosférica (0,1 MPa); (iii) temperatura ambiente e sob pressão (50, 75 e 100 MPa). Adicionalmente à microflora endógena, algumas amostras foram inoculadas com *Escherichia coli* e *Listeria innocua* e submetidas a AH de forma a compreender o comportamento destes microrganismos quando submetidos a estas condições de armazenamento (sendo as amostras sempre comparadas com amostras controlo armazenadas sob refrigeração e à temperatura ambiente).

No segundo estudo realizado com sumo de melancia pasteurizado por alta pressão a 600 MPa à temperatura ambiente e durante 6 minutos (Modelo 55, Hiperbaric, Burgos, Espanha), as amostras foram já processadas na sua embalagem final de duas diferentes formas: a) contendo ar no interior da embalagem e b) sem vestígios de ar no interior da embalagem, de forma a permitir concluir se a existência de ar dentro da embalagem tem impacto no resultado final. Depois de pressurizadas foram armazenadas em três diferentes condições durante vários dias (0, 4, 7, 10, 15, 30 e 75 dias): (i) sob refrigeração (4 °C) e pressão atmosférica (0,1 MPa); (ii)

temperatura ambiente ($\approx 21\text{ }^{\circ}\text{C}$) e pressão atmosférica (0,1 MPa); (ii) temperatura ambiente e sob pressão de 50 MPa.

3.3. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas mediante a adição de 1,0 mL de sumo de melancia em 9,0 mL de uma solução de Ringer. Posteriormente efetuaram-se diluições decimais (10^{-2} a 10^{-4}) e prepararam-se os diferentes meios de cultura específicos necessários de acordo com tipo de microrganismo pretendido.

- Os MAT e PAT foram quantificados em meio de cultura PCA (Plate count agar, Merk, Germany) e incubados a $30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 e 5 dias, respetivamente (ISO 4833: 2003);
- As ENT foram incubadas em meio de cultura VRBDA (*Violet red bile dextrose agar*, (Merk, Germany) a $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (ISO 8523: 1991)
- Os BL foram quantificados em RBCA (*Rose-bengal chloramphenicol agar*, Merk, Germany) e incubados a $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias (ISO 7984: 1987);
- A *E. coli* foi enumerada após incubação em CCA (*Coliform count agar*, Merk, Germany) a $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas;
- A *L. innocua* foi enumerada em meio de cultura específico de *Listeria* spp. (PALCAM, Merk, Germany), ao qual foi previamente adicionado o respectivo suplemento seletivo de PALCAM (FD061) e incubada a $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas (ISO 11290: 1997).

Para as contagens das colónias em cada placa de petri foram consideradas contagens entre 10 a 300 Unidades Formadoras de Colónias (UFC), excetuando os BLEM que as contagens foram entre 10 e 150 UFC. Os resultados das amostras foram expressas em Log UFC por mililitro de sumo de melancia (Log UFC/mL). As colónias foram calculadas segundo a equação 1 (ISO, 4833:2003).

$$N = \frac{\sum \text{colónias}}{V[(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d]} \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

N- Unidade formadora de colónias por mililitros de sumo (UFC/mL)

V- volume da amostra (mL) – 1,0 mL para TAM, ENT, TAP, 0,2 mL para bolores e leveduras, *L. innocua* 10 mL e *E. coli* 10 μL .

n₁- Numero de placas contáveis na primeira diluição

n₂- Numero de placas contáveis na segunda diluição

d- Primeira diluição contável

Todos os resultados registados nas amostras das análises microbiológicas foram obtidos a partir de duplicados de amostra e triplicado de microbiologia. Os limites de quantificação inferior e superior utilizados são de 1 e 6 Log₁₀ UFC/mL, respetivamente.

3.4. Análises físico-químicas

3.4.1. pH e acidez titulável

O pH das amostras foi medido mediante o uso de um eléctrodo de vidro calibrado (pH electrode 5014, Crison Instruments, S.A., Spain) à temperatura de 25 °C. A acidez titulável para cada amostra foi determinada com um titulador automático (Titromatic 1S, Crison Instruments, SA, Espanha) por titulação de 10 mL de sumo de melancia diluído (3 mL de sumo de melancia e 7 mL de água destilada) com uma solução padronizada de 0,02 M de hidróxido de sódio de modo as amostras atingirem um valor de pH de 8,1. Os resultados foram expressos em g de ácido cítrico/mL de sumo de melancia (**Liu et al. 2012a**).

3.4.2. Grau de acastanhamento e turbidez

A determinação do grau de acastanhamento das amostras foi realizada após a centrifugação de sumo a 4 °C durante 20 minutos seguida pela leitura da absorvância do sobrenadante a 420 nm (Microplate Spectrophotometer Multiskan Go, Thermo Scientific, USA) (**Zhang et al. 2011**). Em relação à determinação da turbidez das amostras, este valor foi obtido através da medição direta da absorvância a 700 nm, recorrendo a um espectrofotómetro de UV-VIS (Microplate Spectrophotometer Multiskan Go, Thermo Scientific, USA).

3.4.3. Sólidos solúveis totais

O conteúdo de sólidos solúveis totais (SST) foi determinado por medição do °Brix utilizando um refratómetro (Handheld Refractometer Atago ATC-IE, Tóquio, Japão) a 20 °C com base no método oficial AOAC Official Method 932,12 e os resultados foram expressos em percentagem (%) de sacarose.

3.4.4. Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton et al. 1965), mediante a mistura de 125 µL de sumo de melancia com 500 µL de água destilada, seguido pela adição de 125 uL de reagente de Folin-Ciocalteu. A mistura foi agitada vigorosamente e mantida no escuro durante 6 minutos. Posteriormente adicionou-se 1,25 mL de uma solução de carbonato de sódio 7% (w/v), seguido por agitação vigorosa. Depois de 60 minutos foi medida a absorvância a 760 nm utilizando um espectrofotómetro de UV-VIS. O conteúdo fenólico total foi expresso em µg de ácido gálico/mL, após preparação de uma curva de calibração de ácido gálico (0-200 ug/mL), tendo-se obtido a seguinte reta de calibração (equação 2);

$$A = 0,0051C_{\text{ácido gálico}} + 0,0322 \text{ (equação 2)}$$

onde A é a absorvância a 760 nm e o $C_{\text{ácido gálico}}$, a concentração do ácido gálico (µg/L) de cada amostra, $R^2 = 0,9927$.

3.4.5. Cor

A medição da cor foi feita usando o espectrofotómetro Konica MinotaCM 2300d (Osaka, Japan). Este aparelho mede os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , de acordo com a Comissão internationale de l'éclairage sistema (CIE) sendo os dados processados pelo software NX SpectraMagic™ (Konika Minolta, Osaka, Japão) de acordo com a Comissão Internacional em regulamentos de iluminação: vermelho/verde (a^*), amarelo/azul (b^*) e luminosidade (L^*). Para calcular a diferença total de cor (ΔE^*) utilizou-se a equação seguinte (equação 3);

$$\Delta E^* = [(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2]^{1/2} \text{ (equação 3)}$$

onde ΔE^* é a diferença de cor total entre a amostra e o controlo (valores iniciais), L^* e L_0^* representam a luminosidade, a^* e a_0^* são a vermelho escuro e b^* e b_0^* são o amarelo claro da amostra e do controlo, respectivamente.

3.4.6. Licopeno total

O teor de licopeno foi medido de acordo com a metodologia proposta por **Davis et al. (2003)**. A 0,6 g de sumo de melancia foi adicionado 5 mL de uma solução de hidroxitolueno butilado (BHT 0,05%, m/v) em acetona, 5 mL de etanol USP-grade e 10 mL de hexano. Em seguida esta mistura foi centrifugada a 320×g durante 15 minutos a 4 °C. De seguida adicionou-se 3 mL de água destilada sendo a mistura agitada novamente e deixada em repouso para permitir a separação das fases. No fim, a absorvância da fase superior (camada de hexano) foi medida a 503 nm utilizando como branco o hexano. A seguinte equação (equação 4) permitiu a determinação do teor de licopeno em cada amostra:

$$\text{Licopeno} = \frac{A_{503} \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times L} \quad (\text{equação 4})$$

onde MW é o peso molecular do licopeno (536,9 g/mol), DF é o factor de diluição, L é o comprimento da trajetória (1 cm) e ϵ é o de extinção molar para o licopeno (172,000 L.mol/cm). Teor de licopeno foi expressa em mg/L de sumo de melancia.

3.5. Análises Bioquímicas

3.5.1. Atividade da Polifenoloxidase (PPO)

Na avaliação da atividade da PPO a metodologia utilizada baseou-se no método proposto por **Duangmal et al. (1999)** com algumas modificações. Num tubo de ensaio com 0,6 mL de amostra misturou-se 2,4 mL de substrato a 30 °C (100 mM de catecol em 100 mM tampão citrato, pH 5,4) e mediu-se a absorvância a 420 nm (Microplate Spectrophotometer Multiskan Go, Thermo Scientific, USA) durante 5 minutos. O cálculo da velocidade inicial da atividade enzimática de cada reação foi obtido através do declive da zona linear da curva da variação de absorvância *versus* temperatura.

3.5.2. Atividade da Peroxidase (POD)

O método de avaliação da atividade POD baseou-se no método proposto por **Chailds et al. (1975)** com algumas adaptações. Numa cuvete contendo 50 µL de amostra é adicionada 50

μL de ABTS e 1,9 mL de volume final de tampão de acetato de sódio 0,1 M. A referida mistura é pré-incubada a 30 °C com 100 μL de peróxido de hidrogênio a 0,5 mM de modo a iniciar a reação e formação do cátion radical ABTS identificado a 414 nm durante os primeiros 5 minutos. A velocidade inicial de cada reação foi obtida através do declive da zona linear da curva de variação da absorvância *versus* temperatura.

3.5.3. Atividade da pectina metilesterase (PME)

A avaliação da atividade da PME foi realizada tendo por base o método de **Hagerman et al. (1986)**. A medição da atividade enzimática foi realizada a um pH constante de 7,5 com a utilização de uma solução de NaOH 2 M. A reação enzimática resulta da adição de 4 mL de solução de pectina cítrica (0,5%, m/v) com 300 mL de azul bromotimol (0,01%, m/v) a amostra de sumo de melancia que já se encontra previamente a pH 7,5 (utilizando-se NaOH 0,5 M), perfazendo um volume total de 6 mL. O cálculo da velocidade inicial de cada reação foi realizado através do declive da zona linear da curva de variação da absorvância *versus* temperatura.

O cálculo da atividade residual em todas as enzimas é calculado com base na equação 5 da representada em baixo.

$$\text{Atividade residual (\%)} = \frac{\text{atividade da enzima em cada condição}}{\text{atividade da enzima da amostra inicial}} \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1. Armazenamento de sumo de melancia fresco

4.1.1. Análises microbiológicas

4.1.1.1. Microrganismos Aeróbios Mesófilos e Psicrófilos

Nas **Figuras 6 e 7** encontram-se representados os resultados obtidos para os MAT e PAT após 10 dias de armazenamento sob as diferentes condições. Os valores da carga microbiológica média inicial das amostras de sumo de melancia fresco, referentes aos microrganismos MAT e PAT foram $4,07 \pm 0,12$ e $4,26 \pm 0,07$ log UFC/mL, respetivamente, sendo muito similares aos obtidos por **Fidalgo et al. (2013)** e **Santos et al. (2014)** usando também sumo de melancia. Na **Figura 6** é possível verificar um aumento para ≥ 6 log UFC/mL da carga em MAT após 10 dias de armazenamento à pressão atmosférica (refrigerado e temperatura ambiente), assim como nas amostras armazenadas a 50 MPa à temperatura ambiente.

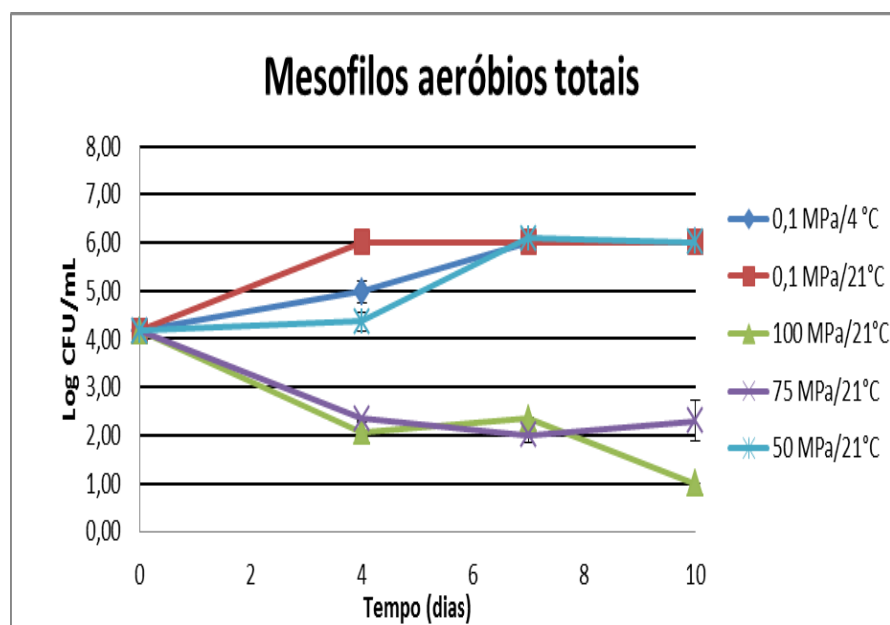


Figura 6. Contagem de mesófilos aeróbios totais (MAT) (Log UFC/mL) no sumo de melancia fresco, inicialmente e durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento.

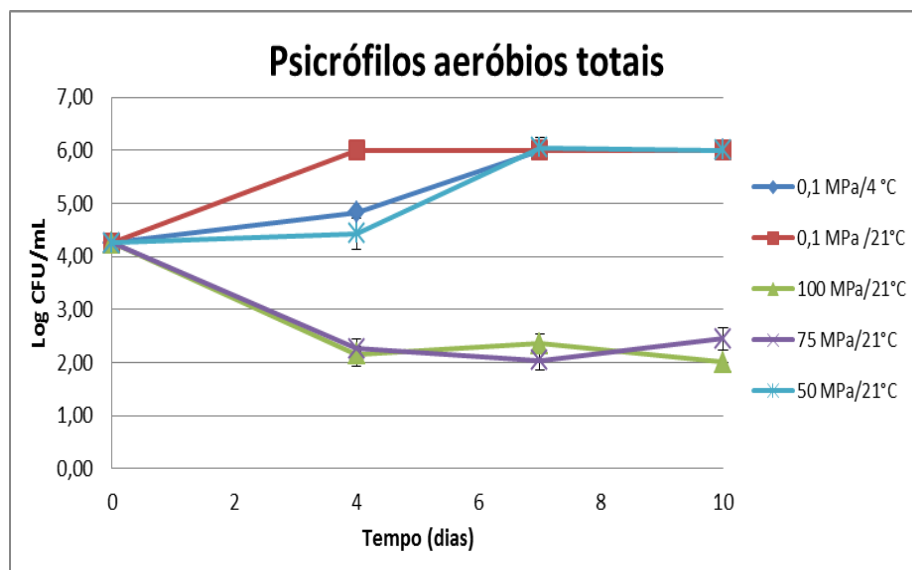


Figura 7. Contagem dos psicrófilos aeróbios totais (PAT) (Log UFC/mL) no sumo de melancia fresco, inicialmente e durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento.

Pelo contrário, nas amostras armazenadas a 75 e 100 MPa a carga microbológica foi de aproximadamente 2 log UFC/mL ao final de 10 dias. Estes resultados demonstraram que não só o AH tem um efeito inibitório no crescimento microbiano, mas permitiram também a inativação dos microrganismos presentes na amostra. Estes resultados estão em concordância com outros obtidos por **Santos et al. (2014)** e **Fidalgo et al. (2013)**, em amostras de sumo de melancia quando armazenadas em condições hiperbáricas com a utilização de pressões de 75 e 100 MPa durante 8 e 60 horas. Outros autores também observaram uma inibição no crescimento microbiano, como é o caso do sumo de melão fresco armazenado a 50-150 MPa (a 25-37 °C) durante 8 horas (**Queirós et al. 2014**) e do sumo de morango fresco a 25-200 MPa (20 °C) durante 15 dias (**Segovia et al. 2012**).

Além disso, uma redução na carga dos PAT foi observada nas amostras armazenadas a 75 e 100 MPa em comparação com a carga inicial após 10 dias (**Figura 7**). **Pinto et al. (2016)** verificou anteriormente que o AH do sumo de melancia fresco foi eficiente na redução do crescimento de PAT durante 7 dias em comparação com o refrigerado, confirmando os resultados obtidos no presente ensaio.

4.1.1.2. *Enterobacteriaceae*

As contagens iniciais de ENT no sumo de melancia foram de $3,42 \pm 0,27$ log UFC/mL (**Figura 8**), sendo este valor similar aos observados por outros autores (**Fidalgo et al. 2013**;

Santos et al. 2014). Ao longo do tempo de armazenamento e ao fim de 10 dias verificou-se um aumento da carga microbiológica em cerca de 3 log UFC/mL nas amostras armazenadas à pressão atmosférica (sob refrigeração e à temperatura ambiente), como também nas amostras armazenadas a 50 MPa. Pelo contrário as amostras armazenadas a 75 e 100 MPa apresentaram uma redução da carga microbiológica para valores abaixo dos limites de detecção (≤ 1 log UFC/mL) em comparação com os valores iniciais. Este comportamento tinha já sido verificado em estudos anteriores de **Fidalgo et al. (2013)** e **Santos et al. (2014)**, com a utilização de pressões de 100 e 150 MPa durante 60 horas para o mesmo tipo de produto. Uma redução da carga microbiológica de ENT foi também verificada em amostras de sumo de melão fresco após um AH de 8 horas (**Queirós et al. 2014**) e recentemente demonstrada uma redução similar de ENT em amostras de sumo fresco de melancia armazenado sob pressão a ≈ 21 °C durante 7 dias (**Pinto et al. 2016**).

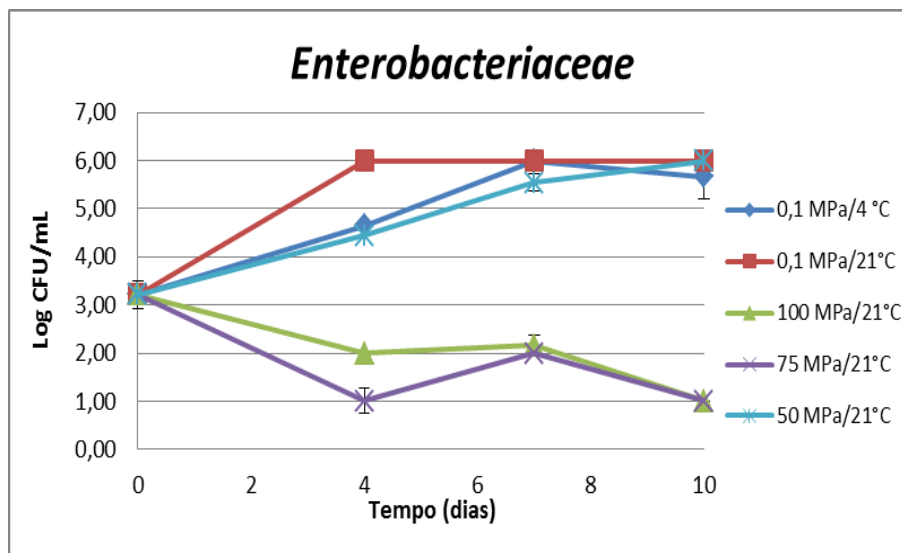


Figura 8. Contagem das *Enterobacteriaceae* (Log UFC/mL) no sumo de melancia fresco, inicialmente e durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento.

4.1.1.3. Bolores e Leveduras

As contagens iniciais de BL nas amostras de sumo de melancia revelaram um valor de $3,57 \pm 0,13$ log UFC/mL, sendo este similar aos obtidos por **Fidalgo et al. (2013)**. O AH demonstrou uma redução da carga microbiológica para valores abaixo dos limites de detecção depois de 10 dias de armazenamento com a utilização de pressões de 50, 75 e 100 MPa (**Figura 9**). Resultados similares foram já verificados por outros autores utilizando sumo fresco de

melancia armazenamento em condições hiperbáricas de 100 e 150 MPa (Fidalgo et al. 2013; Santos et al. 2014).

Nas amostras de sumo refrigeradas e nas armazenadas em condições atmosféricas à temperatura ambiente verificou-se um aumento da carga microbiológica para valores superiores a 6 log UFC/mL após 10 dias.

O AH foi eficiente na promoção da estabilidade da carga microbiológica para os BL, permitindo não só uma inibição de crescimento destes microrganismos mas também uma inativação dos mesmos comparativamente ao valor inicial.

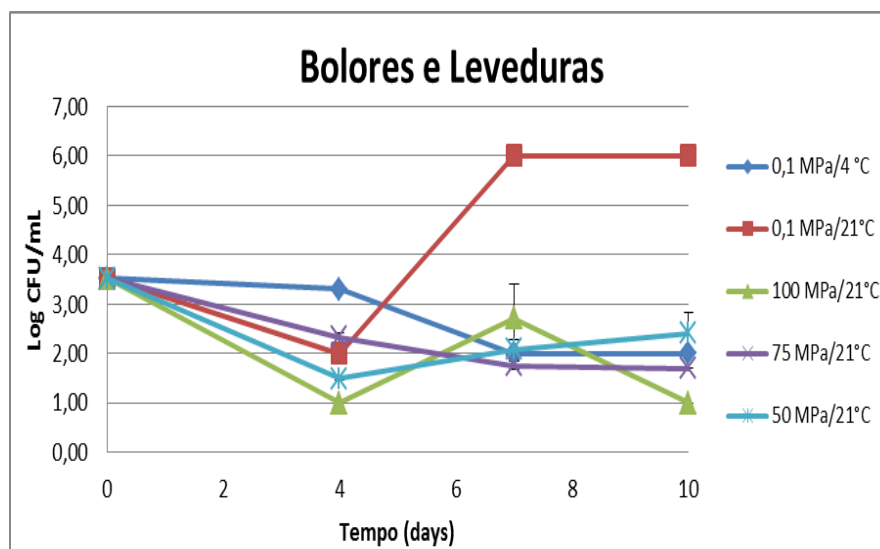


Figura 9. Contagem de bolores e leveduras (Log UFC/mL) no sumo de melancia fresco, inicialmente e durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento.

4.1.1.4. *Escherichia coli*

As contagens iniciais de *E. coli* inoculada nas amostras de sumo de melancia fresco foram de $3,93 \pm 0,02$ log UFC/mL. A partir da **Figura 10** pode-se observar que as amostras referentes ao AH (50, 75 e 100 MPa) apresentaram uma redução da carga microbiana para valores abaixo do limite de detecção (≤ 1 log UFC/mL) ao fim de 10 dias de armazenamento. Relativamente às amostras armazenadas sob refrigeração e à temperatura ambiente (à pressão atmosférica) os valores encontrados foram semelhantes ao inicial e superiores a 6 log UFC/mL, respetivamente, ao final de 10 dias.

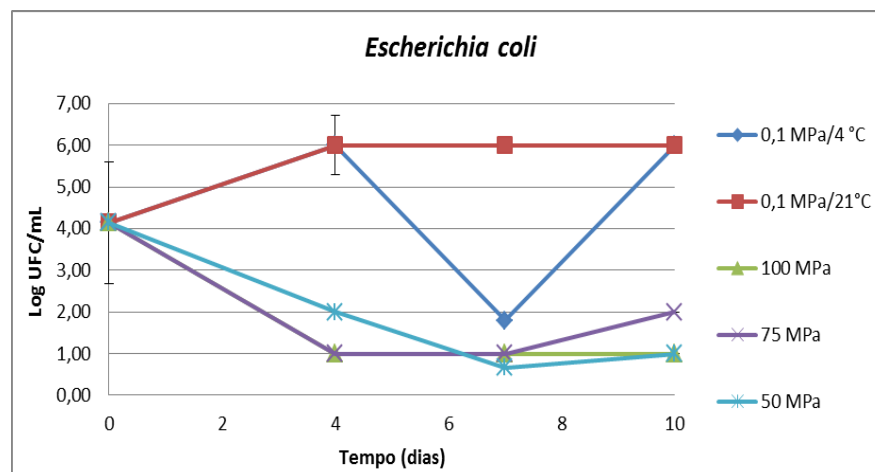


Figura 10. Contagem de *Escherichia coli* (Log UFC/mL) no sumo de melancia fresco, inicialmente e durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento.

4.1.1.5. *Listeria innocua*

A *L. innocua* inoculada nas amostras de sumo de melancia fresco apresentou um valor inicial de $4,66 \log \pm 1,45$ UFC/mL. O AH a 100 MPa demonstrou ser eficiente na redução da carga microbiológica inicial para valores abaixo do limite de detecção ($\leq 1 \log$ UFC/mL) ao fim dos 10 dias. Pelo contrário as amostras armazenadas a pressão atmosférica (0,1 MPa) e a 50 e 75 MPa à temperatura ambiente registaram um aumento da carga microbiológica para valores cima de 6 log UFC/mL ao fim dos 10 dias de armazenamento (**Figura 11**). Entretanto verificou-se que os armazenamento sob refrigeração e 50 e 75 MPa o crescimento de *E. coli* foi mais lento comparativamente com o armazenamento a 0,1 MPa/21 °C.

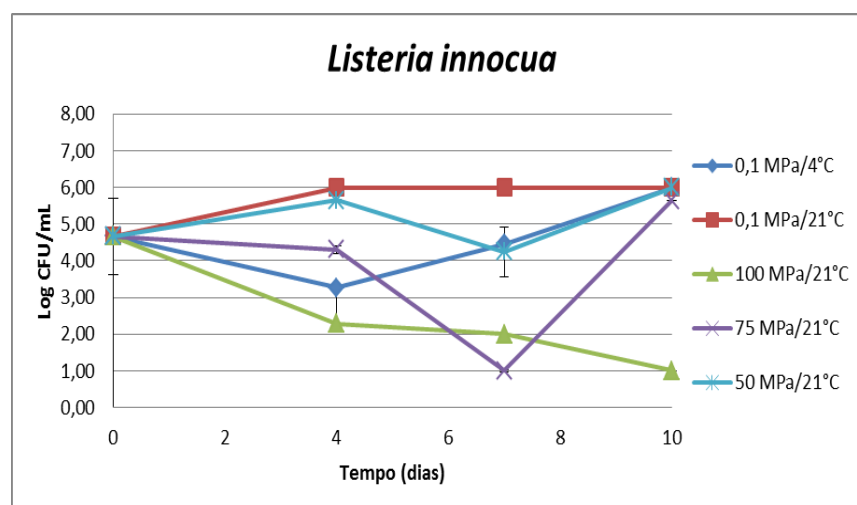


Figura 11. Contagem de *Listeria innocua* (Log UFC/mL) no sumo de melancia fresco, inicialmente e durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento.

4.1.2. Análises Físico-Químicas

4.1.2.1. pH

O valor inicial do pH das amostras do sumo de melancia foi $6,17 \pm 0,07$, estando este um pouco acima dos valores encontrados na literatura (Liu et al. 2012a; Fidalgo et al. 2013; Santos et al. 2014). Após 10 dias de armazenamento o pH de um modo geral manteve-se constante em todas as amostras em condições hiperbáricas e refrigeradas (Figura 12). Esta estabilização do valor de pH foi verificada por outros autores utilizando condições semelhantes de AH à temperatura ambiente com amostras de sumo de melancia fresco armazenado a 75, 100 e 150 MPa durante 8 horas (Santos et al. 2014) e durante 16 horas (Fidalgo et al. 2013).

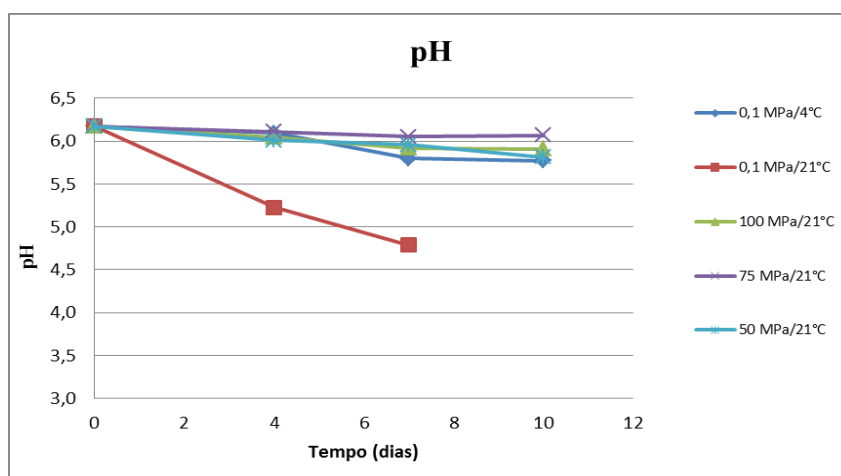


Figura 12. Valor do pH inicial de sumo de melancia fresco e ao longo de 4, 7 e 10 dias de armazenamento a diferentes condições de armazenamento.

No entanto, nas amostras armazenadas a 0,1 MPa à temperatura ambiente, o valor de pH diminuiu em cerca de 1 unidade até ao 7º dia, não tendo sido realizada análise ao 10º dia devido à amostra se encontrar bastante degradada. Similarmente, em Santos et al. (2014) também foi registado uma diminuição do valor do pH no armazenamento a 37 °C a 0,1 MPa depois de 8 horas em amostras de sumo de melancia fresco.

4.1.2.2. Acidez titulável

O valor inicial da AT nas amostras do sumo de melancia foi de $411,68 \pm 0,91$ ácido cítrico mg/L. A AT apresentou um ligeiro aumento nas amostras armazenadas em condições hiperbáricas e nas amostras refrigeradas, sendo este aumento mais acentuado nas amostras armazenadas a 0,1 MPa à temperatura ambiente onde se verificou um aumento de quase

quatro vezes em relação ao valor inicial ao longo do tempo (**Figura 13**). Este aumento da acidez titulável foi igualmente identificado na literatura em amostras de sumo melão e de melancia frescos depois de armazenadas durante 8 horas à pressão atmosférica nas temperaturas de 4, 30 e 37 °C (**Queirós et al. 2014; Santos et al. 2014**). Estes resultados estão em concordância com o valor de pH obtido nas respectivas amostras como ser resultado da atividade metabólica das leveduras (**Sahota et al. 2014**).

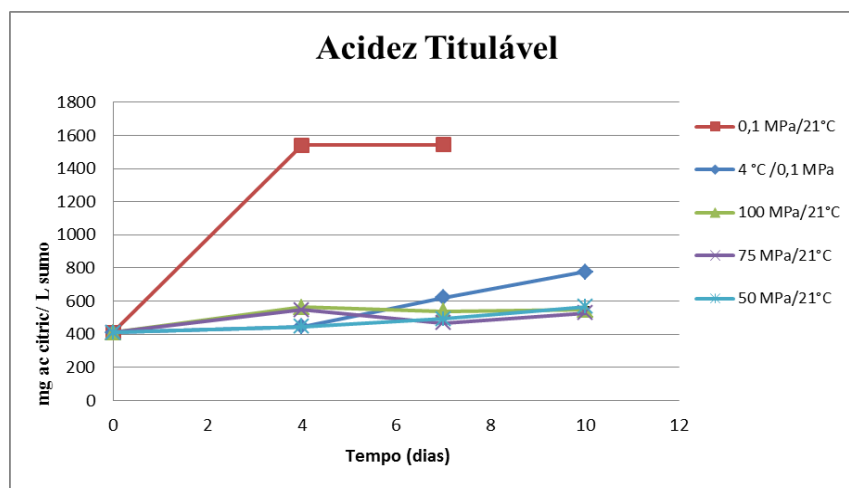


Figura 13. Valor da acidez titulável inicial de sumo de melancia fresco e ao longo de 4, 7 e 10 dias a diferentes condições de armazenamento.

4.1.2.3. Grau de acastanhamento

O grau de acastanhamento inicial das amostras de sumo de melancia fresco foi $0,263 \pm 0,03$, valor similar ao registado na literatura (**Fidalgo et al. 2013; Santos et al. 2014**).

O valor de grau de acastanhamento avaliado ao longo de tempo de armazenamento apresentou-se variável nas amostras utilizadas. Os valores aumentaram pronunciadamente nas amostras armazenadas 75 MPa à temperatura ambiente, sendo também verificado um aumento ligeiro nas amostras armazenadas a 50 MPa. Enquanto nas amostras armazenadas a 100 MPa o grau do acastanhamento diminuiu em relação ao valor inicial (**Figura 14**), e similarmente nas amostras armazenadas a 0,1 MPa (temperatura ambiente e refrigeração). A redução do valor do grau acastanhamento nas amostras a 100 MPa em comparação com as a 50 e 75 MPa pode dever-se ao efeito da pressão ser mais elevada.

Resultados similares foram obtidos a 0,1, 50 e 75MPa a 30 °C por **Santos et al. (2014)**, exceto a 100 MPa a 20 °C, em que foi verificado um aumento do grau de acastanhamento depois de 8 horas. Noutro estudo foi verificado uma redução do grau de acastanhamento em

geral em todas as amostras depois de 8 horas em comparação com o valor inicial (**Fidalgo et al. 2013**)

O efeito da pressão no grau de acastanhamento foi anteriormente verificado em amostras de sumo de melancia quando sujeitas a tratamentos por alta pressão de 200, 400 e 600 MPa durante 60 minutos (**Liu et al. 2013**). O grau de acastanhamento de sumo de melancia pode ser influenciado pela atividade enzimática da PPO e da POD, onde a sua inativação pode ser conseguida com tratamentos por alta pressão (**Liu et al. 2012a**).

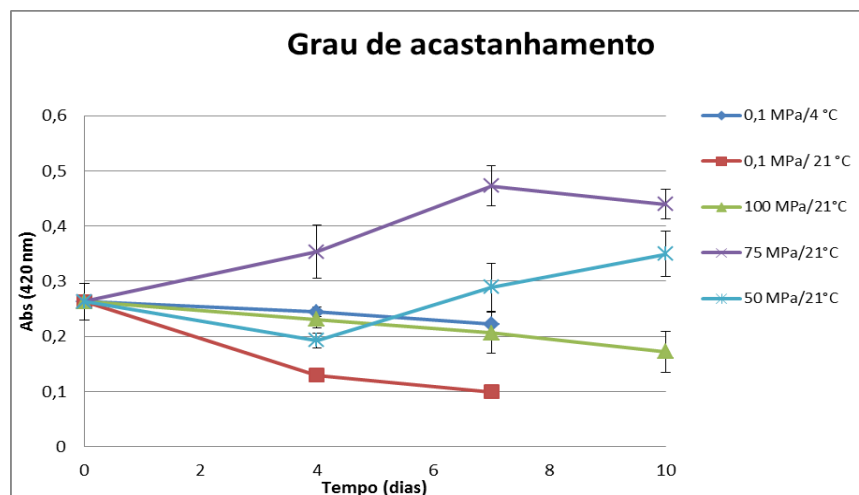


Figura 14. Grau de acastanhamento inicial de sumo de melancia fresco e após 4, 7 e 10 dias de armazenamento a diferentes condições de armazenamento.

4.1.2.4. Cor

A cor vermelha do sumo de melancia constitui uma característica de qualidade extremamente crucial e decisiva na escolha dos consumidores, podendo modificar-se durante o processamento e armazenamento. Esta característica é devida ao licopeno, um carotenoide presente na melancia (**Perkins et al. 2001**).

A cor foi avaliada com base nos parâmetros instrumentais da cor (L^* , a^* , b^*) nas amostras iniciais e após 4, 7 e 10 dias de armazenamento. Os valores iniciais dos parâmetros L^* , a^* , b^* foram $33,77 \pm 0,47$, $11,41 \pm 0,43$ e $6,72 \pm 0,72$ respetivamente, sendo semelhantes aos verificados na literatura (**Aguiló et al. 2010b**; **Rawson et al. 2011**; **Liu et al. 2012a**; **Fidalgo et al. 2013**).

Os valores de L^* e a^* obtidos de um modo geral mantiveram-se constante em todas as amostras de sumo durante o tempo de armazenamento, em relação ao valor inicial (ANEXO A). No entanto no valor de b^* verificou-se uma diminuição ligeira, mais acentuada nas

amostras a 100 MPa depois de 10 dias. Estes resultados indicam que o valor de b^* nas amostras a 100 MPa não caracterizou numa perda de cor significativa como pode se demonstrar pela manutenção da variação de cor, ΔE . (**Figura 15**). Estes estão estando em concordância com a maior quantidade de licopeno verificada nas mesmas amostras, como está representado na **Figura 16**, mas não com o menor grau de acastanhamento das mesmas amostras (**Figura 14**).

Outros resultados foram verificados por outros autores em amostras de melancia armazenadas a 100 MPa onde registaram um aumento do valor de L^* e diminuição de a^* e como consequência numa maior variação de total de cor (ΔE^*) após um armazenamento de 60 horas (**Fidalgo et al. 2013**). Outros autores obtiveram resultados similares em que o valor de L^* aumentou no sumo de morango armazenado durante 15 dias a 25, 100 e 220 MPa (a 20 °C) (**Segovia et al. 2012**). As diferenças encontradas nestes sumos ao nível da cor podem estar relacionadas com o efeito da pressão no armazenamento, previamente verificadas por **Santos et al. (2014)** e **Prada et al. (2016)**.

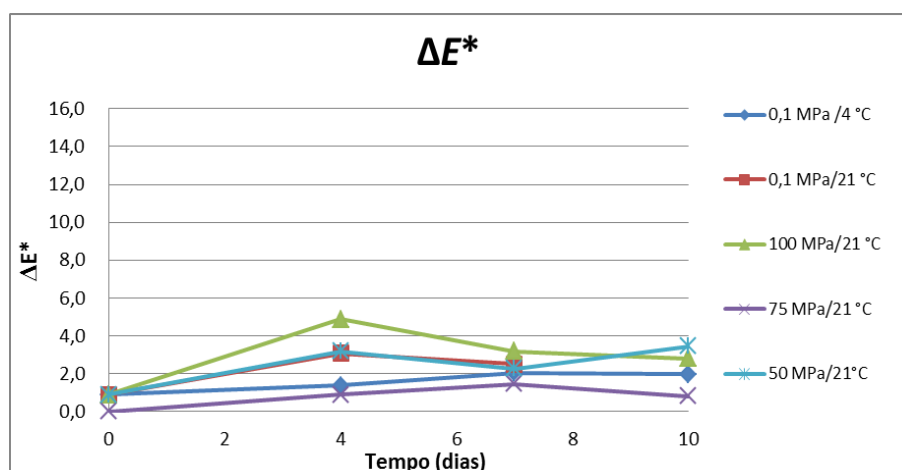


Figura 15. Variação de total de cor (ΔE^*) inicial e depois de 4, 7 e 10 dias de armazenamento em diferentes condições de armazenamento de sumo fresco.

4.1.2.5. Licopeno

O valor inicial obtido para o licopeno foi de $1,21 \pm 0,11$ mg/L, este valor é superior ao verificado na literatura ($62,56 \mu\text{g/mL}$) (**Liu et al. 2013**). O conteúdo em licopeno no sumo de melancia apresentou diferentes variações ao longo dos diferentes tipos de armazenamento (**Figura 16**). Nas amostras armazenadas a 0,1 e 75 MPa o conteúdo em licopeno aumentou ao final de 7 dias de armazenamento para valores entre $1,45 \pm 0,015$ e $1,55 \pm 0,18$ mg/mL

verificando-se que nas amostras armazenadas sob refrigeração o conteúdo em licopeno decresceu ao 10º dia de armazenamento para $1,01 \pm 0,05$ mg/mL. Este aumento foi mais acentuado nas amostras armazenadas a 100 MPa para $1,93 \pm 0,03$ mg/mL em conteúdo em licopeno. Este resultado pode indicar que neste de nível pressão a perda da concentração em licopeno pode ser atenuada em comparação com as outras amostras. No entanto a literatura refere que em tratamentos por alta pressão onde a aplicação de 500 e 600 MPa contribuíram para perdas consideráveis do conteúdo de licopeno total em comparação com o controle não pressurizado (Liu et al. 2013).

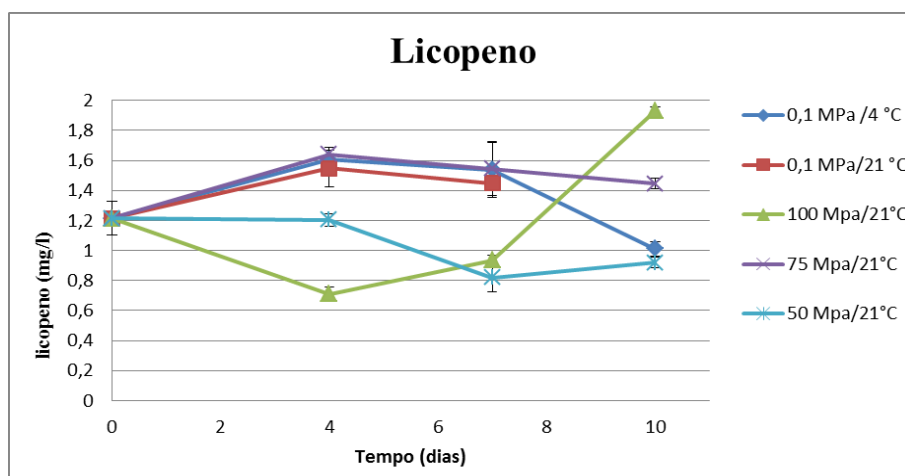


Figura 16. Valor inicial de licopeno em sumo de melancia fresco e após 4, 7 e 10 dias de armazenamento a diferentes condições

4.1.2.6. Compostos fenólicos

O valor inicial de compostos fenólicos para o sumo foi de $265,8 \pm 0,3$ µg/mL, sendo superior ao encontrado na literatura (178,1, 16,17µg/mL) (Fidalgo et al. 2013; Liu et al. 2013). O conteúdo de compostos fenólicos em geral nas amostras armazenadas à pressão atmosférica e sob pressão evidenciou uma diminuição na quantidade de compostos fenólicos, sendo mais evidente nas amostras a 50 e 100 MPa, exceto nas amostras do armazenamento refrigerado, neste o conteúdo aumentou no fim de 10 dias (Figura 17). Este comportamento foi já verificado por Fidalgo et al. (2013) e Bermejo et al. (2015a) que também obtiveram uma diminuição dos compostos fenólicos nos seus estudos. Estes autores deram como possível explicação para esta diminuição o efeito da pressão nas atividades enzimáticas da PPO e POD durante o armazenamento.

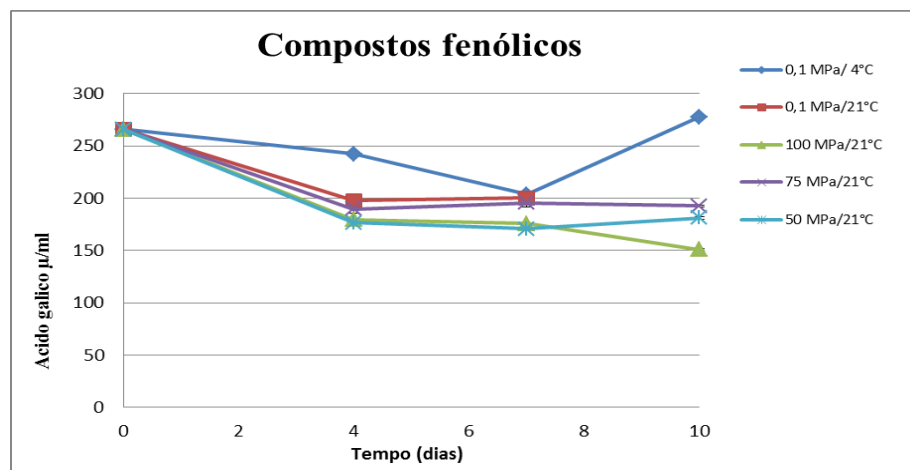


Figura 17. Valor inicial de compostos fenólicos no sumo de melancia fresco e após 4, 7 e 10 dias a diferentes condições de armazenamento.

4.1.2.7. Turbidez

O valor inicial da turbidez foi de $0,64 \pm 0,06$, semelhante ao obtido por **Fidalgo et al. (2013)** e **Santos et al. (2014)**. De um modo geral a turbidez no sumo de melancia fresco diminuiu no AH em comparação com o refrigerado, tendo-se verificado um aumento deste valor para as amostras armazenadas à pressão atmosférica após 10 dias em relação ao valor inicial (**Figura 18**). Este comportamento foi anteriormente verificado por outros autores que estudaram o AH em sumo de melancia fresco, onde obtiveram menores valores de turbidez nas amostras armazenadas sob pressão a 100 MPa à temperatura ambiente (**Fidalgo et al. 2013**), e nas amostras a 50, 75, 150 MPa (25 °C) e 75 e 150 MPa (30 °C) (**Santos et al. 2014**) em comparação ao armazenamento refrigerado depois de 8 horas. Em sumo de morango armazenado em condições hiperbáricas (25, 100 e 220 MPa a 20 °C) a turbidez foi menor ao fim de 15 dias em comparação com as armazenadas à pressão atmosférica (a 20 °C) (**Bermejo et al. 2015b**). Estes autores referem que existe a possibilidade da atividade enzimática da PME poder ser afetada pela pressão durante o AH e assim contribuir para a atenuação da turbidez do sumo de melancia.

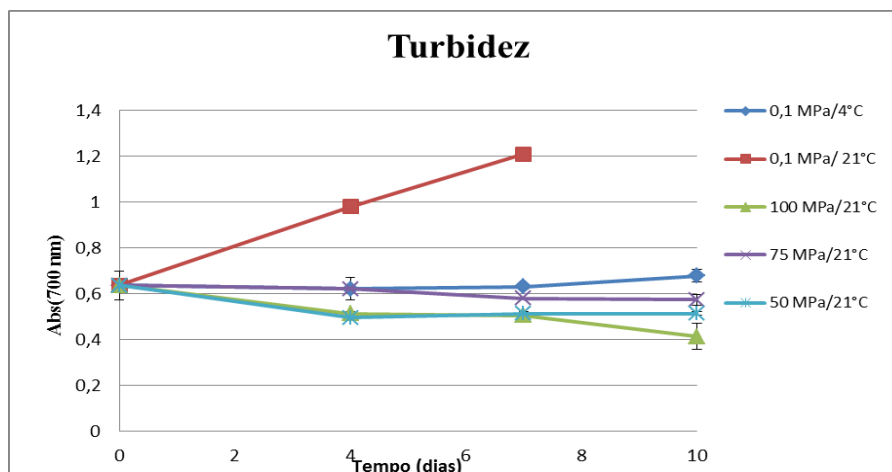


Figura 18. Valor da turbidez inicial de sumo de melancia fresco e após 4, 7 e 10 dias de armazenamento a diferentes condições.

4.1.2.8. Sólidos solúveis totais

O valor inicial dos sólidos solúveis totais (SST) foi de $8,07 \pm 0,05$ °Brix, valor similar ao verificado na literatura ($9,55 \pm 0,63$, $7,1 \pm 0,1$ e $7,00 \pm 0,07$) (Liu et al. 2012a; Fidalgo et al. 2013; Santos et al. 2014). O valor do SST nas amostras armazenadas sob refrigeração e nas armazenadas a 100 MPa manteve-se constante ao longo do tempo (Figura 19). Em contrapartida as armazenadas a 75 MPa, o valor dos SST aumentou ligeiramente enquanto nas amostras armazenadas a 50 MPa diminuiu. A 0,1 MPa e temperatura ambiente verificou-se uma diminuição acentuada no valor de SST. Estes resultados obtidos estão em concordância com a literatura, onde os SST do AH de sumo de melancia fresco não se alterou durante as 8 horas (Santos et al. 2014) e durante 60 horas (Fidalgo et al. 2013).

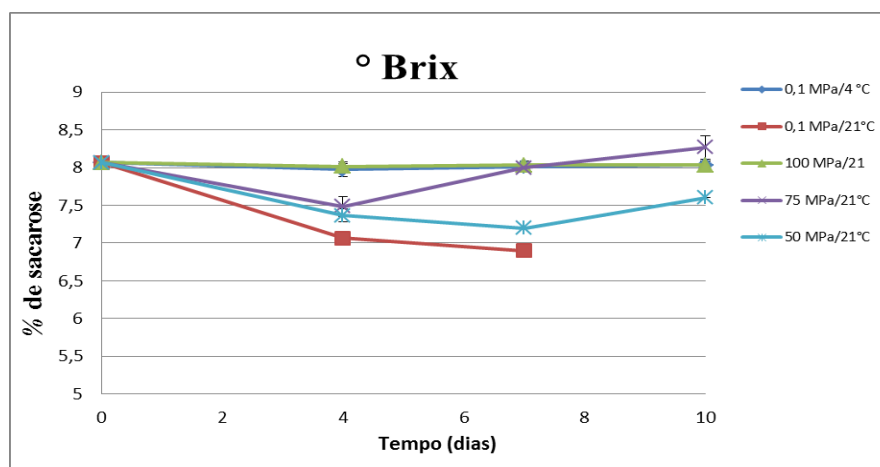


Figura 19. Valor inicial de sólidos solúveis totais (SST) (°Brix) de sumo de melancia fresco e após 4, 7 e 10 dias de armazenamento

4.1.3. Análises Bioquímicas

4.1.3.1. Atividade da Polifenoloxidase (PPO)

A atividade enzimática inicial da PPO obtida no sumo de melancia foi de $0,01 \pm 0,00$ abs/min/mL. A AR da PPO das amostras de sumo de melancia armazenadas durante 10 dias está representada na **Figura 20**. A atividade residual da PPO decresceu em todas amostras até ao 4º dia de armazenamento, sendo esta diminuição mais acentuada nas amostras armazenadas a pressão atmosférica. Entre o 4º e 10º dia observou-se que a 75 MPa a atividade residual da PPO aumentou comparativamente às restantes amostras, verificando-se que nas amostras armazenadas a 50 e 100 MPa a atividade residual foi semelhante às refrigeradas ao final dos 10 dias.

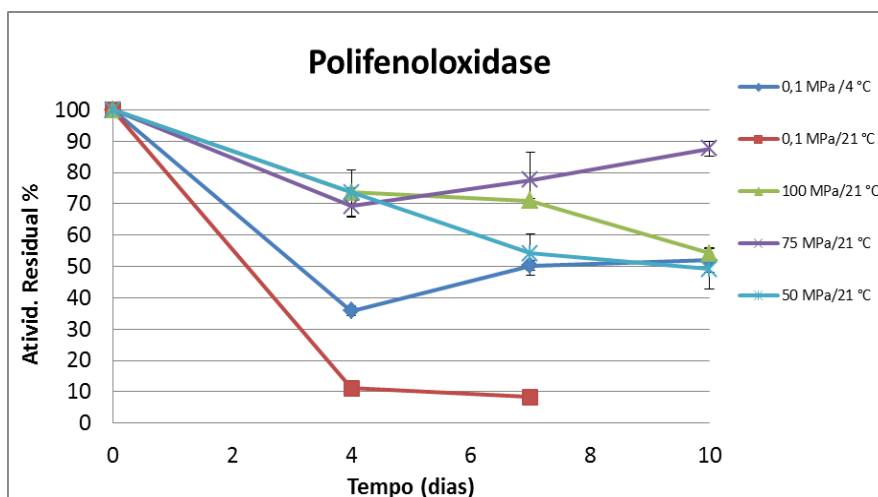


Figura 20. Atividade residual (AR) da PPO do sumo de melancia fresco, durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento de sumo fresco.

A literatura refere que tratamentos por alta pressão (10, 20, 30 MPa a 60 minutos, 50 °C) de sumo de melancia evidenciaram uma diminuição da atividade residual da PPO com o tempo de tratamento. No entanto o aumento da atividade nas amostras armazenadas a 75 MPa pode estar relacionado com as duas frações da isoenzima da PPO presentes no sumo da melancia. A fração mais sensível à pressão pode ser inativada, enquanto a outra fração ser mais estável à pressão (**Liu et al. 2012b**). Efeito semelhante na PPO foi verificado em sumo de morango após armazenamento sob pressão (50 e 220 MPa) a 20 °C durante 15 dias, registando-se um aumento da atividade residual (**Bermejo et al. 2015b**).

4.1.3.2. Atividade da Peroxidase (POD)

A atividade enzimática inicial da POD para o sumo de melancia foi de $0,57 \pm 0,01$ abs/min/mL. A AR da PPO das amostras de sumo de melancia armazenadas durante 10 dias está representada na **Figura 21**. A atividade da POD de um modo geral diminuiu em todas as amostras ao longo do tempo de armazenamento. Essa diminuição na atividade residual foi superior nas amostras armazenadas a 100 MPa, sendo inferior nas amostras armazenadas a pressão atmosférica e temperatura ambiente. Estes resultados indicaram que a atividade enzimática da POD foi afetada pelo tempo e pela pressão utilizada durante os 10 dias de armazenamento. Resultados similares foram obtidos no AH de sumo morango (200 MPa durante 15 dias a 20 °C), a redução da atividade da POD foi de apenas 15% e nas restantes amostras a 50 MPa não houve alteração significativa (**Bermejo et al. 2015b**). Em estudos anteriores, a atividade da POD no sumo de melancia fresco também diminuiu após um processamento por alta pressão de 200, 400 e 600 MPa à temperatura ambiente durante 60 minutos (**Liu et al. 2013**) e em tratamentos com pressões de 10, 20 e 30 MPa a 50 °C durante 60 minutos (**Liu et al. 2012b**).

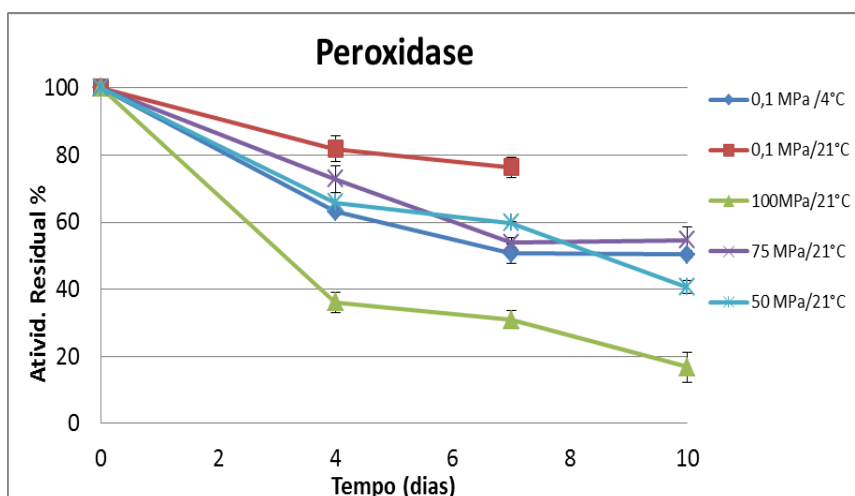


Figura 21. Atividade residual (AR) da POD do sumo de melancia fresco, durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento de sumo fresco.

4.1.3.3. Atividade da Pectina metilesterase (PME)

A atividade enzimática inicial da PME obtida foi de $0,04 \pm 0,01$ abs/min/mL. A avaliação da AR da PME no sumo de melancia armazenado durante os 10 dias está representada na **Figura 22**. Ao longo do tempo armazenamento verificou-se uma diminuição, sendo mais

acentuada a 100 MPa. Os resultados obtidos foram semelhantes aos obtidos por outros autores utilizando sumo de morando armazenado a 200 MPa (20 °C) durante 15 dias (**Bermejo et al. 2015b**). No presente AH detetou-se uma diminuição da AR da PME sendo afetada pelo tempo de armazenamento e pelo nível de pressão utilizada. Em estudos anteriores foi possível verificar uma redução da atividade da PME em tratamentos por alta pressão de 10, 20 e 30 MPa (50 °C) durante 60 minutos (**Liu et al. 2012b**) e com pressões entre 300-900 MPa (60°C) durante 5 a 60 minutos (**Zhang et al. 2011**) também no sumo de melancia.

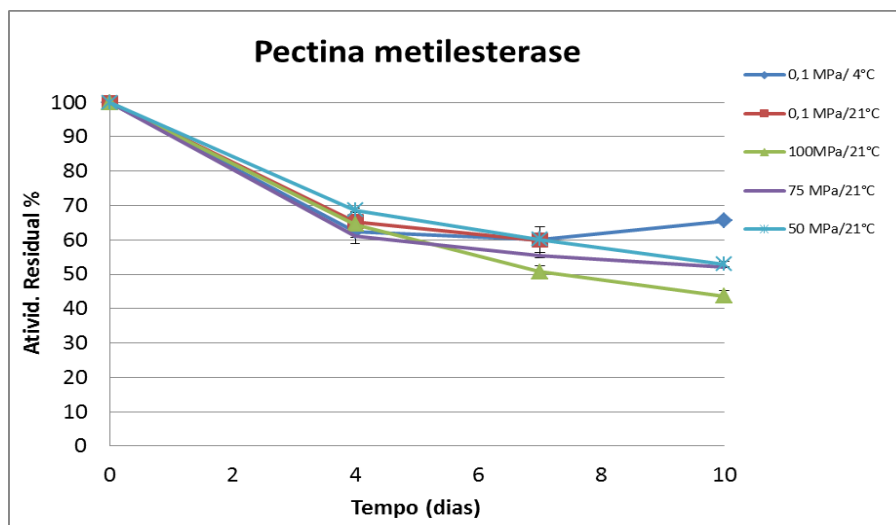


Figura 22. Atividade residual (AR) da PME do sumo de melancia fresco, durante 10 dias em diferentes condições de armazenamento de sumo fresco.

4.2. Armazenamento de sumo pasteurizado por alta pressão

4.2.1. Análises microbiológicas

A carga microbiológica inicial das ENT, antes e após pasteurização por alta pressão foi de ≤ 1 log UFC/mL, sendo inferior a valores verificados por outros autores (**Fidalgo et al. 2013; Santos et al. 2014**). Por outro lado, relativamente aos MAT, a carga microbiológica inicial foi de $3,41 \pm 0,12$ log UFC/mL (semelhante a valores verificados por **Fidalgo et al. (2013)** e por **Santos et al. (2014)**), sendo reduzida após pasteurização por alta pressão para valores inferiores a 1 log UFC/mL.

A carga microbiológica das ENT nas três condições estudadas manteve-se constante durante os 75 dias (≤ 1 log UFC/mL). A presença/ausência de ar na embalagem não mostrou ser importante para a qualidade microbiológica final do produto uma vez que os valores obtidos foram iguais em todas as amostras/condições de armazenamento.

Contrariamente, nas amostras armazenadas a 0,1 MPa à temperatura ambiente, o crescimento microbiano dos MAT aumentou para 6 log UFC/mL logo no 15º dia, o que não detetado nas amostras armazenadas nas amostras refrigeradas e 50 MPa ao longo dos 75 dias .

Nos BL os resultados obtidos foram de ≤ 1 log UFC/mL, mantendo-se constantes ao longo dos 75 dias nas amostras refrigeradas e armazenadas a 50 MPa em ambos os tipos de embalagem (com ar e sem ar). Nas amostras armazenadas à pressão atmosférica no embalagem com ar registou-se um aumento de valores abaixo do limite de deteção (≤ 1 log UFC/mL) para $3,67 \pm 0,78$ log UFC/mL no 4º dia, embora este valor tenha depois voltado a diminuir para ≤ 1 log UFC/mL nos seguintes dias de amostragem, podendo estar assim presente neste caso um erro experimental/contaminação da amostra no momento da análise. Estes resultados indicaram que o AH do sumo de melancia pasteurizado por alta pressão (cuja carga microbiológica era de ≤ 1 log UFC/mL para MAT, ENT e BL) conseguiu inibir o crescimento de microrganismos vegetativos que se pudessem desenvolver a partir de possíveis esporos presentes na amostra, assim como pode ter inativado alguns microrganismos vegetativos que possam ter surgido durante os dias de armazenamento a que o sumo foi sujeito.

4.2.2. Análises Físico-Químicas

4.2.2.1. pH

O valor inicial de pH obtido no sumo de melancia processado por alta pressão foi de $6,1 \pm 0,02$ e $6,0 \pm 0,03$ para com e sem ar respetivamente, sendo estes valores similares ao verificado por **Liu et al. (2013)** e um pouco acima dos valores encontrados por outros autores (**Liu et al. 2012a; Fidalgo et al. 2013; Santos et al. 2014**). Ao longo do tempo de armazenamento verificou-se uma pequena redução de valor do pH em comparação com o inicial. O valor de pH não apresentou diferenças entre as amostras armazenadas a 0,1 MPa e a 50 MPa. No entanto nas amostras a 0,1 MPa verificou-se um aumento de cerca de uma unidade no pH apenas no dia 7 nos embalamentos sem ar, deverá ser erro de manuseamento durante a leitura (**Tabela 3**).

4.2.2.2. Cor

Os parâmetros iniciais da cor (L^* , a^* e b^*) obtidos para o sumo de melancia HPP são similares aos obtidos por **Liu et al (2013)** após tratamento de amostras de sumo de melancia (200 a 600 MPa, 25 e 33 °C durante 15 a 60 minutos).

Os resultados obtidos indicaram um ligeiro aumento do valor de L^* nas amostras armazenadas sob refrigeração e a 50 MPa com ar e sem ar (**Tabela 4**). Em relação ao valor de a^* foram encontradas diferenças nos dois tipos de embalamentos (com ar e sem ar), nas três condições de armazenamento. Nas amostras armazenadas a 50 MPa verificou-se que o valor de a^* diminuiu pronunciadamente logo ao dia 4, mas aumentou depois dos 75 dias para valores inferiores ao valor inicial. Nas amostras refrigeradas até ao dia 15 não houve diferenças em ambas as embalagens, mas a partir deste dia verificou-se um aumento de a^* no dia 30, seguido por uma diminuição depois de 75 dias nos embalamentos sem ar. Nos embalamentos com ar, registou-se uma diminuição no dia 30 e um aumento no dia 75.

Tabela 3. Valores dos parâmetros físicos-químicos do sumo pasteurizado a 600 MPa embalado com e sem ar, durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento.

Parametros		Temperatura	Pressão	Dia de armazenamento						
				0	4	7	10	15	30	75
pH	Com ar	21°C	50 MPa	6,06±0,02	5,88±0,01	5,74±0,08	5,83±0,10	5,82±0,01	5,69±0,03	5,64±0,01
			0,1 MPa	6,06±0,02	6,03±0,06	5,79±0,05	5,72±0,01	5,77±0,03		
		4 °C	0,1 MPa	6,06±0,02	5,90±0,02	5,87±0,02	5,76±0,02	5,69±0,03	5,63±0,11	5,81±0,01
	Sem ar	21°C	50 MPa	6,00±0,03	5,88±0,03	5,73±0,03	5,83±0,02	5,78±0,01	5,65±0,04	5,68±0,00
			0,1 MPa	6,00±0,03	5,97±0,01	6,67±0,07	5,73±0,02	5,73±0,02		
		4 °C	0,1 MPa	6,00±0,03	5,88±0,01	5,84±0,04	5,79±0,11	5,78±0,01	5,71±0,06	5,87±0,02
Sólidos solúveis totais (° Brix)	Com ar	21°C	50 MPa	8,03±0,06	8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00
			0,1 MPa	8,03±0,06	8,00±0,00	8,10±0,00	8,00±0,00	8,03±0,00		
		4 °C	0,1 MPa	8,03±0,06	8,03±0,06	8,03±0,06	8,03±0,06	8,06±0,06	8,01±0,00	8,01±0,00
	Sem ar	21°C	50 MPa	8,03±0,06	8,00±0,00	8,00±0,06	8,03±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00
			0,1 MPa	8,03±0,06	8,03±0,06	8,03±0,06	8,03±0,06	8,03±0,06		
		4 °C	0,1 MPa	8,03±0,06	8,03±0,00	8,00±0,06	8,00±0,06	8,00±0,06	8,00±0,00	8,00±0,00
Turbidez	Com ar	21°C	50 MPa	1,05±0,01	0,98±0,01	0,59±0,01	0,68±0,02	0,49±0,01	0,64±0,02	0,67±0,01
			0,1 MPa	1,05±0,01	0,82±0,03	0,63±0,07	0,65±0,07	0,59±0,06		
		4 °C	0,1 MPa	1,05±0,01	0,83±0,09	0,55±0,03	0,61±0,05	0,42±0,08	0,54±0,07	0,72±0,02
	Sem ar	21°C	50 MPa	1,07±0,01	0,76±0,01	0,57±0,01	0,62±0,02	0,44±0,01	0,52±0,02	0,65±0,01
			0,1 MPa	1,07±0,01	0,81±0,03	0,66±0,07	0,66±0,07	0,42±0,06		
		4 °C	0,1 MPa	1,07±0,01	0,91±0,09	0,68±0,03	0,66±0,05	0,70±0,08	0,68±0,07	0,72±0,02
Grau de acastanhamento	Com ar	21°C	50 MPa	0,08±0,01	0,07±0,00	0,11±0,00	0,07±0,02	0,08±0,00	0,10±0,00	0,46±0,02
			0,1 MPa	0,08±0,01	0,05±0,00	0,06±0,00	0,33±0,02	0,35±0,06		
		4 °C	0,1 MPa	0,08±0,01	0,08±0,01	0,13±0,00	0,09±0,00	0,14±0,01	0,07±0,01	0,37±0,03
	Sem ar	21°C	50 MPa	0,06±0,00	0,05±0,00	0,05±0,01	0,06±0,01	0,011±0,00	0,16±0,10	0,26±0,01
			0,1 MPa	0,06±0,00	0,08±0,00	0,26±0,02	0,32±0,03	0,31±0,05		
		4 °C	0,1 MPa	0,06±0,00	0,05±0,00	0,05±0,01	0,06±0,01	0,11±0,00	0,16±0,10	0,46±0,01

Tabela 4. Valores da variação de cor ΔE^* do sumo pasteurizado embalado com e sem ar a 600 MPa, durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento.

Dia	ΔE^*					
	Com ar			Sem ar		
	50MPa/ 21°C	0,1MPa/ 21°C	0,1MPa/ 4°C	50MPa/ 21°C	0,1MPa/ 21°C	0,1MPa/ 4°C
4	3,90±0,48	1,34±0,09	5,59±0,90	2,54±1,48	0,65±0,29	0,58±0,55
7	0,57±0,37	0,99±0,15	4,50±1,02	0,79±0,37	0,94±0,17	0,78±0,59
10	1,23±0,18	5,17±0,44	2,89±0,49	0,91±0,54	0,40±0,15	0,76±0,42
15	0,81±0,58	6,90±0,14	0,65±0,3	1,02±0,85	0,21±0,11	0,31±0,18
30	1,65±0,26		4,02±0,23	0,31±0,20		0,68±0,65
75	7,03±0,47		6,21±0,58	7,25±0,25		3,08±0,38

Em relação ao valor de b^* não existem diferenças nas três condições de armazenamento nem entre os dois tipos de embalagem no tempo avaliado. O valor inicial foi de $6,20 \pm 0,31$ (com ar) e $6,99 \pm 0,44$ (sem ar). Este parâmetro nas amostras refrigeradas e nas armazenadas a 50 MPa apresentaram um comportamento semelhante. O valor de b^* depois de 75 dias de armazenamento foi inferior ao inicial em ambos os tipos de embalamentos. No entanto, no armazenamento a 0,1 MPa à temperatura ambiente, o valor de b^* , apresentou ligeiras diferenças entre os dois tipos de embalamentos, mantendo-se constante até ao dia 4, seguido por diminuição no dia 7 em ambos os casos, mas nos embalamentos com ar verificou um pequeno aumento.

Comportamento semelhante foi verificado nas amostras de sumo armazenado a 50 MPa nos dois tipos de embalamentos em relação à variação total de cor (ΔE^*) como se pode ver na **Tabela 4**. Nestas amostras a alteração de cor foi semelhante em ambas as embalagens. Nos embalamentos sem ar as três condições apresentaram uma variação semelhante até ao dia 30, a partir desta altura verificou-se um aumento da variação de cor nas amostras armazenadas sob pressão em comparação com as refrigeradas no dia 75. Enquanto no embalamento com ar foram observadas diferenças na cor, principalmente nas amostras armazenadas a 0,1 MPa em que se registou um aumento do ΔE^* logo no dia 15, enquanto nas restantes condições a variação da cor aumentou progressivamente ao longo dos 75 dias.

O AH conseguiu atenuar a degradação de cor nos primeiros 30 dias em ambos os tipos de embalamentos, no entanto depois dos 75 dias o ΔE^* aumentou de $3,90 \pm 0,048$ para $7,03 \pm 0,48$ e $2,54 \pm 1,48$ para $7,25 \pm 0,25$ nas amostras de 50 MPa com e sem ar, respetivamente. O aumento de ΔE^* nas amostras pressurizadas depois do dia 30 está relacionado com o elevado valor de a^* no dia 75. Este aumento no ΔE^* foi igualmente verificado nas amostras

armazenadas a 0,1 MPa, onde se observou visivelmente elevadas alterações na cor devido ao ΔE^* ser próximo e superior a 3,0. Alguns autores também reconheceram que a variação total de cor no sumo de melancia fresco armazenado durante 60 horas nas mesmas condições hiperbárica a 100 MPa devia-se à diminuição do valor de a^* (Fidalgo et al. 2013). O AH a 50 MPa do sumo de melancia HPP das amostras sem ar causou menores alterações de cor ($\Delta E^*=0,31$) até ao dia 30 em comparação com o AH (25, 100, 220 MPa) a 20 °C durante 15 dias de sumo de morango fresco ($\Delta E^*=1$) (Segovia et al, 2012).

4.2.2.3. Turbidez

A turbidez inicialmente medida nos dois tipos de embalamentos de sumo HPP foi de $1,05 \pm 0,08$ e $1,07 \pm 0,01$ para com e sem ar, respetivamente. Este valor obtido é semelhante ao verificado na literatura (Fidalgo et al. 2013; Santos et al. 2014).

A turbidez de um modo geral diminuiu em todas as amostras até ao dia 15 posteriormente aumentando ligeiramente. Nas amostras embaladas com ar não existiu diferenças nas três condições testadas. No entanto nas embaladas sem ar verificou-se que a partir do dia 15 a turbidez nas amostras armazenadas a 50 MPa foi inferior às refrigeradas, como se pode verificar na **Tabela 3**. Semelhante diminuição na turbidez foi previamente observada noutros armazenamentos hiperbáricos do mesmo sumo a 100 MPa e à temperatura ambiente (Fidalgo et al. 2013), e a 50, 75, 150 MPa (25 °C) e 75 e 150 MPa (30 °C) (Santos et al. 2014) quando comparada com amostras refrigeradas durante 8 horas. Em condições hiperbáricas, a 25, 100 e 220 MPa a 20 °C, a turbidez do sumo de morango obtida foi igualmente inferior ao sumo armazenado em condições atmosféricas (20 °C) depois de 15 dias (Bermejo et al. 2015b).

4.2.2.4. Sólidos solúveis totais

O valor inicialmente obtido para os SST do sumo de melancia HPP foi de $8,03 \pm 0,06$ em ambos os tipos de embalamentos, sendo o valor inferior aos obtidos por (Liu et al. 2013) após aplicação de HPP e superior noutros autores (Liu et al. 2012a; Fidalgo et al. 2013; Santos et al. 2014). Este valor não variou muito entre os dois tipos de embalamentos, nem entre as três condições de armazenamento ao longo dos 75 dias. Em ambos os embalamentos os SST mantiveram-se constantes ao longo dos 75 dias nas amostras armazenadas a 50 MPa

em contraste com as refrigeradas, nestas verificou-se um ligeiro aumento nas amostras armazenadas com ar (**Tabela 3**). Resultados semelhantes foram anteriormente verificados no AH durante 8 horas (**Santos et al. 2014**) e durante 60 horas (**Fidalgo et al. 2013**) em sumo fresco de melancia.

4.2.2.5. Grau de acastanhamento

O sumo de melancia HPP apresentou um grau de acastanhamento inicial de $0,06 \pm 0,00$ (com ar) e de $0,08 \pm 0,01$ (sem ar) respetivamente. Estes valores são semelhantes aos resultados obtidos por **Zhang et al. (2011)** após aplicação de 600 MPa (à 60 °C) durante 5 e 60 minutos mas são inferiores em comparação com os resultados obtidos por **Fidalgo et al. (2013)**.

A partir da observação da **Tabela 3**, o grau de acastanhamento em todas as amostras aumentou ao longo do tempo de armazenamento. Este aumento do grau de acastanhamento foi mais acentuado logo no dia 15 nas amostras a 0,1 MP à temperatura ambiente nos dois tipos de embalamentos. Nas restantes condições de armazenamento esse aumento do grau de acastanhamento foi proporcional ao decorrer do tempo estudado, atingido o valor máximo no dia 75. Este aumento no grau de acastanhamento foi igualmente verificado nas amostras refrigeradas e nas amostras de AH a 50 MPa (a 30 °C) de sumo de melancia (fresco) depois de 8 horas (**Santos et al. 2014**). Noutras amostras pressurizadas a 100 MPa (37 °C) e a 150 MPa (25 °C) de sumo de melão (fresco), foi igualmente observado um aumento do grau de acastanhamento depois de 8 horas (**Queirós et al. 2014**).

4.2.3. Análises Bioquímicas

4.2.3.1. Atividade da polifenoloxidase

A atividade enzimática da PPO inicialmente medida nas amostras de sumo de melancia HPP embalado com e sem ar foi respetivamente $0,008 \pm 0,001$ e $0,008 \pm 0,001$ abs/min/mL. As **Figuras 23** mostram a AR da PPO nas amostras embaladas com e sem ar. Em todas as amostras HPP de um modo geral a AR diminuiu, não se evidenciando diferenças entre as diferentes condições de armazenamento e de embalamento ao longo dos 75 dias. A inativação das amostras a 50 MPa em ambos os embalamentos foram superior ($27,78 \pm 3,02$ e $25,10 \pm 1,42$ respetivamente com e sem ar) nas amostras refrigeradas sem ar ($26,10 \pm 2,88$) e comparação com as refrigeradas com ar ($22,44 \pm 4,53$). A pressão utilizada no AH reduziu a

AR, mas não causou efeito relevante em ao longo do tempo em comparação com o refrigerado. A diminuição da atividade da PPO pode indicar uma possível inativação enzimática, como resultado da pasteurização a 600 MPa, este efeito foi anteriormente identificado pela utilização de altas pressões (200, 400 e 600 MPa) em amostras de melancia (Liu et al. 2013). Contrariamente, em sumo de morango fresco armazenado em condições hiperbáricas a 50 e 200 MPa a 25 °C durante 15 dias a AR da PPO aumentou em 59 e 52%, respetivamente (Bermejo et al. 2015b).

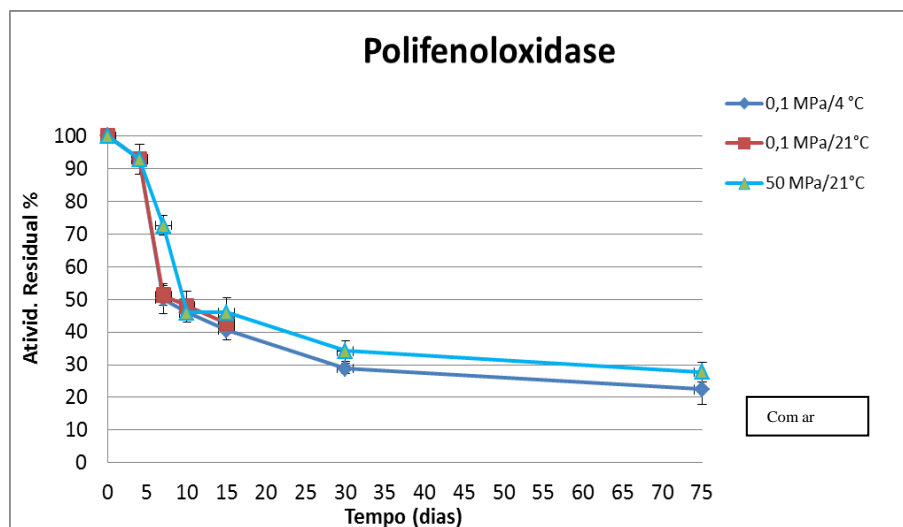


Figura 23 Atividade residual (AR) da PPO do sumo de melancia pasteurizado com ar, durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento.

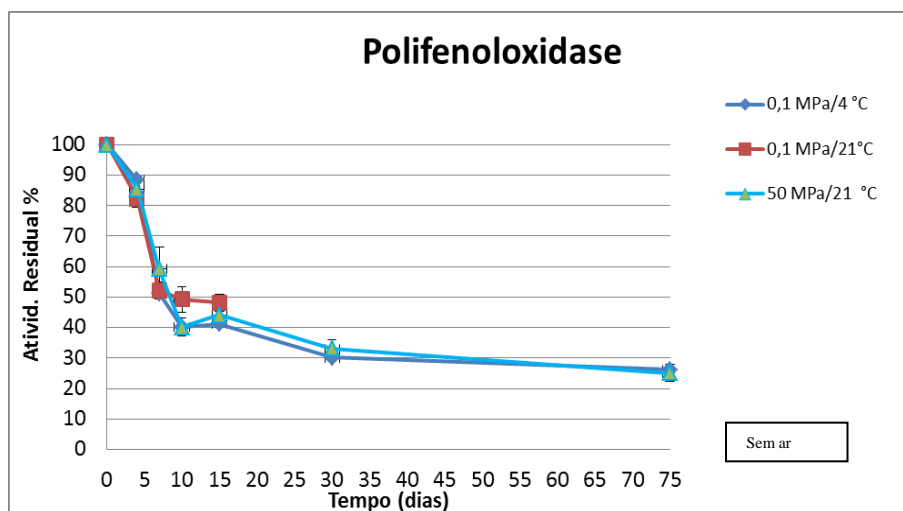


Figura 24. Atividade residual (AR) da PPO do sumo de melancia pasteurizado sem ar, durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento.

4.2.3.2. Atividade da peroxidase

A atividade enzimática da POD inicial do sumo HPP embalado com e sem ar foi respetivamente $0,65 \pm 0,02$ e $0,63 \pm 0,02$ abs/min/mL. A AR da POD apresentou uma redução em todas as condições de armazenamento e de embalagem em cerca de 50% ao longo dos 75 dias. No entanto é possível identificar ligeiras diferenças no sumo refrigerado (com ar) a AR da POD foi a menor ($42,37 \pm 1,52$) em comparação com o refrigerado embalado sem ar ($49,44 \pm 1,12$) e com as dos dois embalamentos a 50 MPa ($50,85 \pm 2,18$ e $50,24 \pm 5,85$ 42 respetivamente com e sem ar) (**Figuras 25 e 26**). O A H a 50 MPa permitiu uma redução em cerca 50% da AR no POD, no entanto o efeito da pressão nesta condição não foi vantajosa. A diminuição da atividade enzimática destas amostras pode ser explicada pela inativação da POD devido à aplicação do processamento inicial de 600 MPa, como foi reportado por outros autores em condições semelhantes (200, 400 e 600 MPa) (**Liu et al. 2013**).

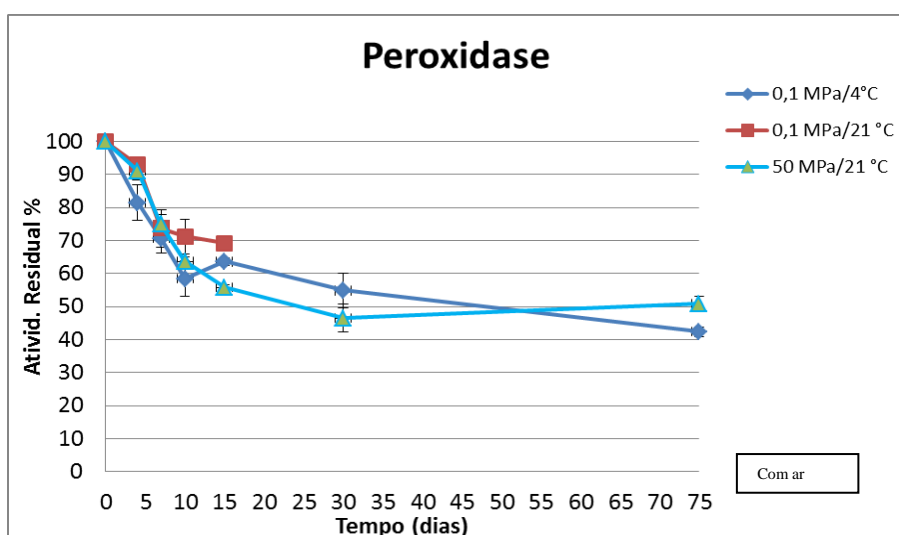


Figura 25. Atividade residual (AR) da POD do sumo de melancia pasteurizado com ar. durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento.

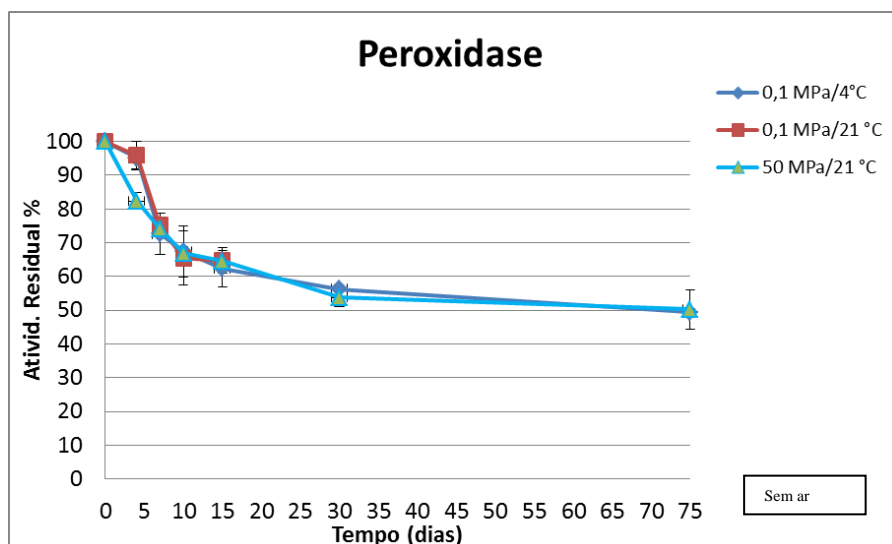


Figura 26. Atividade residual (AR) da POD do sumo de melancia pasteurizado sem ar, durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento.

4.2.3.3. Atividade da pectina metilesterase

A atividade enzimática da PME nas amostras HPP embaladas com e sem ar foi respectivamente $0,0485 \pm 0,001$ e $0,0428 \pm 0,018$ abs/min/mL. A AR da PME encontra-se representada nas **Figuras 27 e 28**, sendo possível observar uma redução da atividade nas três condições de armazenamento estudadas ao longo dos 75 dias. Os embalamentos das amostras com ar obtiveram ligeira diminuição nas refrigeradas ($37,01 \pm 1,39$) e nas a 50 MPa ($35,29 \pm 1,04$) em comparação das sem ar refrigeradas ($43,84 \pm 1,39$) e das a 50 MPa ($51,03 \pm 2,72$). Estes resultados demonstram que a utilização da pressão não permitiu vantagens na medida que a redução da AR na PME foi nos embalamentos com ar. Estes resultados estão em concordância com a atividade da PME obtida em sumo fresco de morango armazenado em condições hiperbáricas semelhantes (50 e 200 MPa a 20 °C) (**Bermejo et al. 2015b**).

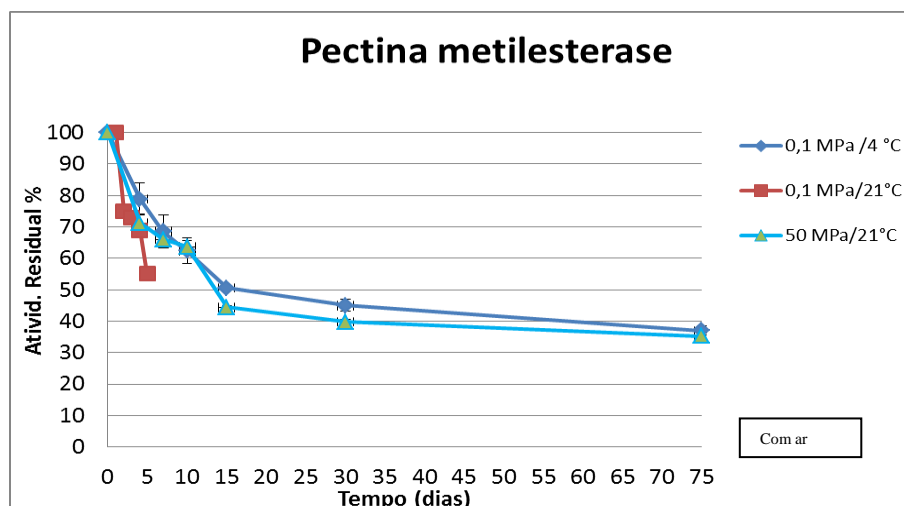


Figura 27. Atividade residual (AR) da PME do sumo de melancia pasteurizado com ar. durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento.

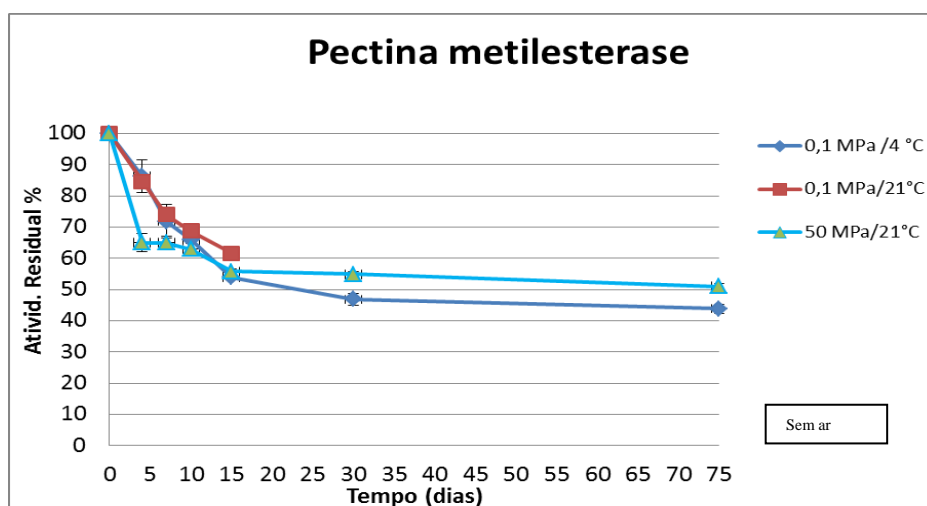


Figura 28. Atividade residual (AR) da PPO do sumo de melancia pasteurizado sem ar. durante 75 dias em diferentes condições de armazenamento.

5.CONCLUSÃO

5. Conclusão

Atualmente, o armazenamento hiperbárico (AH) de produtos alimentares perecíveis tem-se mostrado um método bastante promissor na conservação de alimentos diversos. No presente trabalho pretendeu-se avaliar a qualidade do sumo de melancia após AH à temperatura ambiente, sendo que vários parâmetros microbiológicos, físicos-químicos e bioquímicos foram avaliados em amostras de sumo de melancia fresco armazenado em diferentes condições de pressão (50-100 MPa) durante 10 dias. O AH de sumo de melancia processado por alta pressão (600 MPa durante 6 minutos à $\approx 21^{\circ}\text{C}$) foi também realizado a 50 MPa durante um período de 75 dias.

O AH do sumo de melancia fresco revelou melhores resultados nos parâmetros microbiológicos e físicos-químicos, resultando numa inibição/inativação e consequente redução do crescimento microbiológico, em comparação com o armazenamento refrigerado. Todas as amostras armazenadas a 75 e 100 MPa obtiveram uma redução da carga microbiológica. Verificou-se que para a maior parte dos microrganismos uma inibição/inativação para valores inferiores a 1 log UFC/mL. Contrariamente, nos microrganismos armazenados a 0,1 MPa à temperatura ambiente resultou num aumento da carga microbiológica para valores superiores a 6 log UFC/mL nos MAT, PAT, ENT, BL, *L. innocua* e *E. coli*. No armazenamento refrigerado também se detetou um aumento da carga microbiológica nos MAT, PAT, ENT e BL, mas com uma diminuição no caso da *L. innocua* e *E. coli*.

Relativamente aos parâmetros físicos-químicos analisados, o AH a 50 MPa demonstrou ser capaz de manter vários parâmetros, tais como o pH, acidez titulável, SST, turbidez, compostos fenólicos e licopeno. Em todas as condições hiperbáricas foi demonstrado na eficiência na redução da variação de cor, bem como o grau de acastanhamento. Nas amostras a 100 MPa obteve-se maior concentração de licopeno. No sumo fresco a AR das enzimas foi afetada de forma diferenciada nas diferentes condições de armazenamento. A AR da POD e da PME armazenada a 100 MPa foi inferior em comparação com as outras condições. Enquanto na PPO a AR a 100 MPa foi semelhante às amostras refrigeradas e 50 MPa durante os 10 dias.

No sumo HPP os parâmetros microbiológicos avaliados nas diferentes condições não apresentaram diferenças ao longo dos 75 dias. Nos três tipos de armazenamentos verificou-se que a carga microbiológica (≤ 1 log UFC/mL) manteve-se constante ao longo dos 75 dias.

Estes resultados indicaram que uma vez os microrganismos vegetativos terem sido inativados após o HPP, não houve o crescimento de esporos resistentes. Os parâmetros físicos-químicos avaliados, no sumo HPP armazenado foram diferentes nas três condições estudadas nem nos dois tipos de embalagem. Nas amostras do AH a 50 MPa, este demonstrou ser eficaz na atenuação do pH, turbidez e SST. Contrariamente no refrigerado e no armazenado a 50 MPa o grau de acastanhamento e variação de cor (ΔE^*) aumentaram ao longo dos 75 dias. E por fim verificou-se que a AR das enzimas PPO, POD e PME diminuíram no sumo HPP em todas as condições de armazenamento e nos dois tipos de embalagem depois de 75 dias.

Em conclusão o AH poderá ser um novo método de conservação, demonstrando ter elevado potencial como um novo sistema alternativo à refrigeração. Este método permite economizar gastos energéticos, uma vez que não é necessário controlar a temperatura e a única energia necessária é aquela que é usada para atingir a pressão desejada, não existindo custos energéticos adicionais. Assim, com base nos resultados obtidos no presente trabalho e noutros estudos é necessário mais conhecimento científico nesta área, tais como avaliar a presença de outros microrganismos patogénicos e de esporos, realizar períodos de armazenamentos mais longos com diferentes condições de pressão/temperatura e utilizar testes mais específicos de identificação de microrganismos característicos como também outros parâmetros relacionados com a qualidade. No futuro o AH poderá ser a metodologia de vanguarda mais utilizada na conservação alimentar. Atualmente o AH tem sido alvo de um grande número de pesquisas como é possível comprovar na revisão bibliográfica, sendo a mesma acompanhada por excelentes resultados.

6. Bibliografia

- Aguiló-Aguayo I, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2010a) Color and viscosity of watermelon juice treated by high-intensity pulsed electric fields or heat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11:299–305
- Aguiló-Aguayo I, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2010b) Color and viscosity of watermelon juice treated by high-intensity pulsed electric fields or heat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11:299–305
- Almeida DPF (2003) A cultura da melancia. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto
- Aneja KR, Dhiman R, Aggarwal NK, Aneja A (2014) Emerging Preservation Techniques for Controlling Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Fruit Juices. *Internacional Journal of Microbiology* 2014:14.
- Bermejo-Prada A, López-Caballero ME, Otero L (2015a) Hyperbaric storage at room temperature: Effect of pressure level and storage time on the natural microbiota of strawberry juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*
- Bermejo-Prada A, Otero L (2016) Effect of hyperbaric storage at room temperature on color degradation of strawberry juice. *Journal of Food Engineering* 169:141–148
- Bermejo-Prada A, Segovia-Bravo KA, Guignon B, Otero L (2015b) Effect of hyperbaric storage at room temperature on pectin methylesterase activity and serum viscosity of strawberry juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 30:170–176.
- Bermejo-Prada A, Vega E, Pérez-Mateos M, Otero L (2014) Effect of hyperbaric storage at room temperature on the volatile profile of strawberry juice. *LWT - Food Science and Technology*.
- Bevilacqua A, Corbo MR, Campaniello D, et al (2011) Shelf life prolongation of fruit juices through essential oils and homogenization : a review. In: *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Rresearch and Ttechnological Advances*, A. Méndez-. Italy, pp 1157–1166
- Chailds BE, Bardsley WG (1975) No TitleThe steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(5-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem J* 145:93–103
- Charm SE, Longmaid HE, Carver J (1977) A simple system for extending refrigerated, nonfrozen preservation of biological material using pressure. *Cryobiology* 14:625–636.
- Considine KM, Kelly AL, Fitzgerald GF, et al (2008) High-pressure processing effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters* 281:1–9
- Coulomb D (2008) Refrigeration and cold chain serving the global food industry and creating a better future: two key IIR challenges for improved health and environment. *Trends in Food Science & Technology* 19:413–417
- Davis AR, Fish WW, Perkins-Veazie P (2003) A rapid spectrophotometric method for analyzing lycopene content in tomato and tomato products. *Postharvest Biology and*

Technology 28:425–430.

- Denys S, Ludikhuyze LR, Van Loey AM, Hendrickx ME (2000) Modeling conductive heat transfer and process uniformity during batch high-pressure processing of foods. *Biotechnology Progress* 16:92–101
- Duangmal K, Owusu Apenten RK (1999) A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry* 64:351–359
- Duarte R V., Moreira SA, Fernandes PAR, et al (2014) Preservation under pressure (hyperbaric storage) at 25°C, 30°C and 37°C of a highly perishable dairy food and comparison with refrigeration. *CyTA - Journal of Food* 13:321–328
- Fernandes P a. R, Moreira S a., Fidalgo LG, et al (2014) Food Preservation Under Pressure (Hyperbaric Storage) as a Possible Improvement/Alternative to Refrigeration. *Food Engineering Reviews*
- Fernandes PAR, Moreira SA, Duarte R, et al (2015) Preservation of sliced cooked ham at 25, 30 and 37°C under moderated pressure (hyperbaric storage) and comparison with refrigerated storage. *Food and Bioprocess Technology* 95:200–207
- Fidalgo LG, Santos MD, Queirós RP, et al (2013) Hyperbaric storage at and above room temperature of a highly perishable food. *Food and Bioprocess Technology* 7:2028–2037
- Gardner PT, White TAC, McPhail DB, Duthie GG (2000) The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry* 68:471–474
- Hagerman AE, Austin PJ (1986) Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 34:440–444
- Heinz V, Buckow R (2010) Food preservation by high pressure. *Journal Für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 5:73–81
- Hite BH (1899) The effects of pressure in the preservation of milk. *Bulletin* 58 15–35.
- Hugas M, Garriga M, Monfort J. (2002) New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science* 62:359–371
- James SJ, James C (2010) The food cold-chain and climate change. *Food Research International* 43:1944–1956
- Jannasch H., W., Eimhjellen K., Farmanfarmalan A (1971) Microbial degradation of organic matter in the deep sea. *Science*. 1:672–675
- Kalichevslff MT, Knorr D, LiUford and PJ (1995) Potential food applications of high-pressure effects on ice-water transitions. *Trends in Food Science & Technology* 6:253–259

- Knorr D, Froehling a., Jaeger H, et al (2011) Emerging Technologies in Food Processing. Annual Review of Food Science and Technology 2:203–235
- Ko WC, Hsu KC (2001) Changes in K value and microorganisms of tilapia fillet during storage at high-pressure, normal temperature. Journal of Food Protection 64:94–98
- Liu Y, Hu X, Zhao X, Song H (2012a) Combined effect of high pressure carbon dioxide and mild heat treatment on overall quality parameters of watermelon juice. Innovative Food Science and Emerging Technologies 13:112–119
- Liu Y, Hu X, Zhao X, Song H (2012b) Combined effect of high pressure carbon dioxide and mild heat treatment on overall quality parameters of watermelon juice. Innovative Food Science and Emerging Technologies 13:112–119
- Liu Y, Zhao XY, Zou L, Hu XS (2013) Effect of high hydrostatic pressure on overall quality parameters of watermelon juice. Food Science and Technology International 19:197–207
- Moreira S a., Fernandes P a. R, Duarte R, et al (2015) A first study comparing preservation of a ready-to-eat soup under pressure (hyperbaric storage) at 25°C and 30°C with refrigeration. Food Science & Nutrition 3: 467–474
- Mosqueda-Melgar J, Raybaudi-Massilia RM, Martín-Belloso O (2008) Combination of high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivate pathogenic microorganisms and extend the shelf-life of melon and watermelon juices. Food Microbiology 25:479–491
- Mújica-Paz H, Valdez-Fragoso A, Samson CT, et al (2011) High-Pressure Processing Technologies for the Pasteurization and Sterilization of Foods. Food and Bioprocess Technology 4:969–985
- Norton T, Sun D-W (2008) Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective Processing Technique in the Food Industry. Food and Bioprocess Technology 1:2–34
- Paredes-Sabja D, Gonzalez M, Sarker MR, Torres J a (2007) Combined effects of hydrostatic pressure, temperature, and pH on the inactivation of spores of *Clostridium perfringens* type A and *Clostridium sporogenes* in buffer solutions. Journal of Food Science 72:202–206
- Paterson E, Gordon MH, Niwat C, et al (2006) Supplementation with fruit and vegetable soups and beverages increases plasma carotenoid concentrations but does not alter markers of oxidative stress or cardiovascular risk factors. The Journal of Nutrition 136:2849–2855.
- Patterson MF (2005) Microbiology of pressure-treated foods. Journal of Applied Microbiology 98:1400–9
- Patterson MF, Linton M, Doona CJ (2007) Introduction to High Pressure Processing of Foods. In: Doona CJ, Feeherry .Florence E. (eds) High Pressure Processing of Foods, 1°. Blackwell Publishing Professional, p 7

- Penteado AL, Leitão MFF (2004) Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. *International Journal of Food Microbiology* 92:89–94
- Pereira RN, Vicente AA (2010) Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing
- Perkins-Veazie P, Collins JK, Pair SD, Roberts W (2001) Lycopene content differs among red-fleshed watermelon cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:983–987
- Pinto C, Moreira SA, Fidalgo LG, et al (2016) Shelf-life extension of watermelon juice preserved by hyperbaric storage at room temperature compared to refrigeration. *LWT - Food Science and Technology* 72:78–80
- Prada AMB (2014) Hyperbaric storage of foods at room temperature: characterization in strawberry juice. 357in THesis Ph.D.
- Queirós RP, Santos MD, Fidalgo LG, et al. (2014) Hyperbaric storage of melon juice at and above room temperature and comparison with storage at atmospheric pressure and refrigeration. *Food Chemistry* 147:209–214
- Rastogi NK (2013) *Recent Developments in High Pressure Processing of Foods*. Springer US, Boston, MA
- Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Balasubramaniam VM, et al (2007) Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical reviews in Food Science and Nutrition* 47:69–112
- Rawson A, Tiwari BK, Patras A, et al (2011) Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. *Food Research International* 44:1168–1173
- Rendueles E, Omer MK, Alvseike O, et al (2011) Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology* 44:1251–1260
- Ritz M, Tholozan J., Federighi M, Pilet M. (2002) Physiological damages of *Listeria monocytogenes* treated by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* 79:47–53
- Rupasinghe HPV, Yu LJ (2012) *Emerging Preservation Methods for Fruit Juices and Beverages*. Food Additive 65–82
- Sahota PP, Dhillon HK (2014) Detection and survival of *Cronobacter sakazakii* and *Klebsiella pneumoniae* in naturally fermented black carrot beverage. *International Journal of Advanced Research* 2:627–638
- San Martín MF, Barbosa-Cánovas G V, Swanson BG (2002) Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical reviews in Food Science and Nutrition* 42:627–645

- Santos MD, Queirós RP, Fidalgo LG, et al (2014a) Preservation of a highly perishable food, watermelon juice, at and above room temperature under mild pressure (hyperbaric storage) as an alternative to refrigeration. *LWT - Food Science and Technology* 62:901–905
- Santos MD, Queirós RP, Fidalgo LG, et al (2014b) Hyperbaric storage at and above room temperature of a highly perishable food. *Food and Bioprocess Technology* 7:2028–2037
- Segovia-Bravo KA, Guignon B, Bermejo-Prada A, et al (2012) Hyperbaric storage at room temperature for food preservation: A study in strawberry juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 15:14–22
- Sharma M, Adler BB, Harrison MD, Beuchat LR (2005) Thermal tolerance of acid-adapted and unadapted *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe juice and watermelon juice. *Letters in Applied Microbiology* 41:448–53
- Singleton VL, Rossi J. AJ (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144–158
- Smelt JP, Hellemons JC, Patterson M (2001) Effects of high pressure on vegetative microorganisms. In: Hendrickx M, Knorr D (eds) *Kluwer Aca. New York*, p 55–76. New York
- Smelt JPPM (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology* 9:152–158
- Sun D-W (ed) (2005) Pressure effects on enzyme activity. In: *Emerging Technologies for Food Processing*, Elsevier A. Food Science and Technology, International Series, p 37
- Téllez LSJ., Ramírez JA., Pérez Lamela C., et al. (2001) Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 3:66–80
- Terefe NS, Buckow R, Versteeg C (2014) Quality-related enzymes in fruit and vegetable products: effects of novel food processing technologies, part 1: high-pressure processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54:24–63
- Tewari G, Juneja VK (eds) (2007) *Advances in Thermal and Non-Thermal Food Preservation*, Blackwell. Iowa
- Thakur BR, Nelson PE (1998) High-pressure processing and preservation of food. *Food Reviews International* 14:427–447
- Toepfl S, Mathys A, Heinz V, Knorr D (2006) Review: Potential of High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields for Energy Efficient and Environmentally Friendly Food Processing. *Food Reviews International* 22:405–423
- Torres JA, Velazquez G (2005) Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering* 67:95–112

Yordanov DG, Angelova G V (2010) HIGH PRESSURE PROCESSING FOR FOODS PRESERVING

Zhang C, Trierweiler B, Li W, et al (2011) Comparison of thermal, ultraviolet-c, and high pressure treatments on quality parameters of watermelon juice. Food Chemistry 126:254–260

(2013) CBI Product Factsheet : Fruit Juices in Europe.

(2012) FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.

7. Apêndice

Anexo A–. Parâmetros de medição da cor L^* , a^* e b^* , do sumo de melancia fresco, inicial e nos dias 4, 7 e 10 em diferentes condições de armazenamento

Tabela A 1. Valor da média do parâmetro L^* , inicial e nos dias 4, 7 e 10 em diferentes condições de armazenamento

L^*				
Media				
Condição/Tempo	Inicial	4 Dias	7 Dias	10 Dias
0,1 MPa/21 °C	33,77	34,09	35,01	
0,1 MPa/4 °C	33,77	34,45	35,12	35,25
100 MPa/21 °C	33,77	38,04	36,38	34,59
75 MPa/21 °C	33,77	34,18	34,05	35,69
50 MPa/21 °C	33,77	36,29	35,44	36,25

Tabela A 2. Valor do desvio padrão do parâmetro L^* , inicial e nos dias 4, 7 e 10 em diferentes condições de armazenamento

L^*				
Desvio Padrão				
Condição/Tempo	Inicial	4 Dias	7 Dias	10 Dias
0,1 MPa/21 °C	0,47	0,66	0,14	
0,1 MPa/4 °C	0,47	0,3	0,4	0,28
100 MPa/21 °C	0,47	0,43	0,54	2,44
75 MPa/21 °C	0,47	0,51	0,51	0,34
50 MPa/21 °C	0,47	1,8	0,51	0,33

Tabela A 3. Valor da média do parâmetro a^* , inicial e nos dias 4, 7 e 10 em diferentes condições de armazenamento

a^*				
Media				
Condição/Tempo	Inicial	4 Dias	7 Dias	10 Dias
0,1 MPa/21 °C	11,94	9,34	10,30	
0,1 MPa/4 °C	11,94	12,64	11,38	11,940
100 MPa/21 °C	11,94	9,62	10,46	10,53
75 MPa/21 °C	11,94	11,65	11,91	11,66
50 MPa/21 °C	11,94	10,89	10,66	10,09

Tabela A 4. Valor do desvio padrão do parâmetro a^* , inicial e nos dias 4, 7 e 10 em diferentes condições de armazenamento

a^*				
Desvio padrão				
Condição/Tempo	Inicial	4 Dias	7 Dias	10 Dias
0,1 MPa/21 °C	0,47	0,65905327	0,14	
0,1 MPa/4 °C	0,47	0,3	0,4	0,28
100 MPa/21 °C	0,47	0,43	0,54	1,71
75 MPa/21 °C	0,47	0,51	0,51	0,34
50 MPa/21 °C	0,47	1,8	0,51	0,33

Tabela A 5. Valor da média do parâmetro b^* , inicial e nos dias 4, 7 e 10 em diferentes condições de armazenamento

b^*				
Media				
Condição/Tempo	Inicial	4 Dias	7 Dias	10 Dias
0,1 MPa /21 °C	6,72	4,33	5,29	
0,1 MPa/4 °C	6,72	5,87	5,38	5,53
100 MPa/21°C	6,72	6,93	5,98	4,43
75 MPa/21°C	6,72	5,55	7,09	6,20
50 MPa/21°C	6,72	5,96	6,14	5,30

Tabela A 6. Valor do desvio padrão do parâmetro b^* , inicial e nos dias 4, 7 e 10 em diferentes condições de armazenamento

b^*				
Media				
Condição/Tempo	Inicial	4 Dias	7 Dias	10 Dias
0,1 MPa /21 °C	0,72	0,29	0,16	0,
0,1 MPa/4 °C	0,72	0,19	0,29	0,25
100 MPa/21°C	0,72	0,31	0,39	0,88
75 MPa/21°C	0,72	0,33	0,38	0,24
50 MPa/21°C	0,72	0,87	0,44	0,41